

UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

LA RÉGULATION DE L' APOPTOSE DES OSTÉOCLASTES
HUMAINS PAR DES FACTEURS LOCAUX DE L' OS :
L' OSTÉOPROTÉGÉRINE ET LE «TRANSFORMING GROWTH
FACTOR-BETA»

PAR

NICOLAS HOUDE

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé

En vue de l' obtention du grade de

Maître ès sciences (M.Sc.) en

Immunologie

Février 2009

Évaluateur

Sophie Roux (Directrice de recherche)

Claire Dubois (Service d' Immunologie)

Nathalie Fauchoux (Faculté de Génie, Université de Sherbrooke)



Library and Archives
Canada

Published Heritage
Branch

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Direction du
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence
ISBN: 978-0-494-53396-3
Our file Notre référence
ISBN: 978-0-494-53396-3

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

TABLES DES MATIÈRES

TABLES DES MATIERES	II
LISTE DES ABREVIATIONS	IV
LISTE DES FIGURES	V
LISTES DES TABLEAUX	VI
RESUME.....	
1 INTRODUCTION.....	1
1.1 Le tissu osseux.....	1
1.1.1 Structure de l'os.....	1
1.1.2 Le remodelage osseux.....	2
1.2 Les cellules osseuses	5
1.2.1 Les ostéoblastes.....	5
1.2.2 Les ostéocytes	8
1.2.3 Les ostéoclastes.....	9
1.3 L'apoptose.....	17
1.3.1 Mécanismes de l'apoptose	18
1.3.2 La régulation de l'apoptose	26
1.3.3 Apoptose des ostéoclastes	29
1.4 Le Transforming Growth Factor-β.....	31
1.4.1 La production et la maturation du TGF- β dans l'os	31
1.4.2 La signalisation du TGF- β 1	34
1.4.3 L'induction de l'apoptose par le TGF- β 1.....	37
1.4.4 Les actions du TGF- β 1 dans les cellules osseuses	41
2 MATERIELS ET METHODES.....	46
2.1 Réactifs utilisés	46
2.2 Cultures de monocytes de sang de cordon ombilical.....	46
2.3 Expression et purification de RANKL	48
2.4 Évaluation de l'apoptose par technique du TUNEL	49
2.5 Immunobuvardage de type Western	51
2.6 Immunocytochimie.....	54

2.7	Immunofluorescence	55
2.8	ELISA de TRAIL.....	56
2.9	Extraction d'ARN, RT-PCR et PCR en temps réel.....	56
2.10	59
2.10	Analyses statistiques.....	59
3	OSTEOPROTEGERINE ET APOPTOSE DE L'OSTEOCLASTE	60
3.1	L'ostéoprotégérine diminue l'apoptose des ostéoclastes humains	60
3.2	L'ostéoclaste humain exprime TRAIL.....	61
3.3	L'OPG diminue l'activation de la caspase 8 dans les ostéoclastes humains	67
4	MECANISMES IMPLIQUES DANS L'APOPTOSE DES OSTEOCLASTES HUMAINS INDUITE PAR LE TGF- β 1.....	72
4.1	Les ostéoclastes humains expriment les récepteurs du TGF- β 1.....	74
4.2	Le TGF- β 1 induit l'activation de la caspase 9 dans les ostéoclastes humains	76
4.3	Transduction du signal du TGF- β 1 dans les ostéoclastes humains.....	85
4.4	Le TGF- β 1 augmente l'expression de Bax et de Bim.....	93
5	DISCUSSION	97
6	REMERCIEMENTS	110
7	REFERENCES.....	111
8	ANNEXE	122

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
BMP	Bone Morphogenetic Proteins
CARD	Caspase recruitment domains
CMN	Cellules multinucléées
CTR	Calcitonin receptor
DAPK	Death associated protein kinase
DD	Death domains
DED	Death effector domain
DMSO	Dimethyl sulfoxide
FBS	Fetal bovine serum
FGF	Fibroblast growth factors
IAP	Inhibitor apoptosis protein
IκB	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor
IKK	IκB kinase
IL	Interleukine
JNK	C-Jun N-terminal kinases
LAP	Latency-associated peptide
LLC	Large latent complex
LTBP	Latent TGF-β binding peptide
M-CSF	Macrophage colony growth factor
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MNC	Multinucleated cells
NF-κB	Nuclear factor-kappa B
OPG	Ostéoprotégérine
PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PFA	Paraformaldéhyde
PTH	Parathyroid hormone
RANKL	Receptor Activator for Nuclear Factor κ B Ligand
Rel	V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
SLC	Small latent peptide
SP	Signal peptide
TGF-β	Transforming growth factor beta
TGF-βR	Transforming growth factor-β receptors
TNF	Tumor necrosis factors
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
TRAP	Tartrate resistant acid phosphatase
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labelin

Liste des Figures

Figure 1 : Le remodelage osseux.....	3
Figure 2 : Les cellules osseuses.....	7
Figure 3 : L'ostéoclaste mature.....	12
Figure 4 : Signalisation dans l'ostéoclaste après stimulation par RANKL	15
Figure 5 : Activation des caspases.....	20
Figure 6 : Classification et composition des homologues Bcl-2	24
Figure 7 : Synthèse du TGF- β	33
Figure 8 : Signalisation de la voie des Smads et de la voie des MAPK.....	36
Figure 9 : Effets de l'OPG sur l'apoptose des ostéoclastes	63
Figure 10 : Expression de TRAIL par les ostéoclastes.....	63
Figure 11 : Concentration de TRAIL dans le milieu des cultures d'ostéoclastes	65
Figure 12 : Activation de la caspase 8 par Western Blot	69
Figure 13 : Activation de la caspase 8 par immunofluorescence	70
Figure 14 : Apoptose des ostéoclastes humains induite par différents facteurs	73
Figure 15 : Expression des récepteurs du TGF- β sur les ostéoclastes humains.....	75
Figure 16 : Activation des caspases par immunobuvardage de type Western	78
Figure 17 : Activation des caspases évaluée par immunocytochimie	81
Figure 18 : Apoptose des ostéoclastes en présence d'inhibiteur de caspases	84
Figure 19 : Phosphorylation de JNK par le TGF- β 1	85
Figure 20 : Phosphorylation de ERK, p38 et Smad2 en présence de TGF- β 1	89
Figure 21 : Ligne du temps de la signalisation du TGF- β 1 dans l'ostéoclaste humain.	92
Figure 22 : Expression de Bcl-2 et de Bid évaluée par Western	94
Figure 23 : Expression de Bax et de Bim évaluée par Western	96

Listes des tableaux

Tableau 1 : Anticorps utilisés en Western et en Immunocytochimie et dilutions utilisées	53
Tableau 2 : Amorce pour les PCR de TRAIL et d'actine	58

RÉSUMÉ

Université de Sherbrooke

LA RÉGULATION DE L' APOPTOSE DES OSTÉOCLASTES HUMAINES PAR DES FACTEURS LOCAUX DE L' OS : L' OSTÉOPROTÉGÉRINE ET LE TRANSFORMING GROWTH FACTOR-BETA Nicolas Houde

Mémoire présenté à la faculté de médecine
en vue de l' obtention du grade de
Maître ès en science (M.Sc.), Service d' Immunologie
Février 2009

Le remodelage osseux est un phénomène finement régulé selon la balance de formation et de résorption osseuse. La régulation de la résorption osseuse se fait principalement par l' apoptose des ostéoclastes. Nous avons démontré auparavant que plusieurs facteurs comme TRAIL, FASL et TGF- β 1 induisent l' apoptose des ostéoclastes humains. Par contre, nous ne connaissons pas l' effet de l' OPG sur l' apoptose ostéoclastique en plus de ne pas connaître les mécanismes impliqués dans la mort cellulaire induite par le TGF- β 1 chez les ostéoclastes. Afin de vérifier ces effets, nous avons utilisé une culture primaire d' ostéoclastes humains produite à partir de monocytes de sang de cordon ombilical. Ces ostéoclastes sont différenciés à l' aide du M-CSF et du RANKL. L' OPG est un membre de la famille des récepteurs du TNF. L' OPG est un récepteur soluble pour RANKL et pour TRAIL. Nous avons démontré que l' OPG permettait de diminuer l' apoptose des ostéoclastes cultivés dans un milieu sans M-CSF et sans RANKL. Cette baisse surprenante de la mort a été expliquée par une augmentation d' expression de TRAIL par les ostéoclastes lorsque ceux-ci sont cultivés en absence de ses facteurs de survie (M-CSF et RANKL). L' OPG agit sur l' apoptose en séquestrant le TRAIL produit par les ostéoclastes empêchant ainsi l' induction de l' apoptose par le TRAIL des ostéoclastes environnants. Ceci en fait un mécanisme de régulation autocrine de la survie des ostéoclastes lors du remodelage osseux. De plus, nous avons aussi démontré un mécanisme expliquant l' apoptose des ostéoclastes par le TGF- β 1. Nous avons premièrement démontré la présence des récepteurs de type I et II à la surface des ostéoclastes proposant une action directe du TGF- β 1. Par la suite, nous avons démontré que le TGF- β 1 induisait une activation de la caspase 9 objectivant ainsi une apoptose par la voie mitochondriale. Cette activation de l' apoptose par la voie intrinsèque serait le résultat de l' activation de la voie de p38 des MAPK et de la voie des Smad suivie par une augmentation de l' expression des homologues de Bcl-2 pro-apoptotiques Bax et Bim. En sachant que le TGF- β 1 peut-être libéré et activé de la matrice osseuse lors de la résorption, l' induction de l' apoptose des ostéoclastes par ce facteur de croissance en fait un autre mécanisme de régulation du remodelage osseux.

Mots clé généraux : Apoptose, Ostéoclastes, Ostéoprotégérine, Transforming Growth Factor- β 1, Remodelage

1 Introduction

1.1 Le tissu osseux

Le corps humain comporte un squelette osseux, ayant un rôle de support et de protection des organes vitaux, en plus de participer à l'homéostasie du calcium et du phosphore. En coopération avec les muscles, le squelette nous permet d'effectuer nos mouvements quotidiens. L'os est un tissu vivant complexe constitué d'une matrice extracellulaire minéralisée ainsi que de plusieurs types cellulaires : ostéoblastes, ostéoclastes et ostéocytes. Il renferme dans sa structure les cellules de la moelle hématopoïétique. Chacune de ces cellules est impliquée de façons différentes au niveau de la croissance et de l'homéostasie osseuse (Marks, 2003).

1.1.1 Structure de l'os

Morphologiquement, il y a deux types d'os : l'os cortical et l'os trabéculaire. L'os cortical est un os beaucoup plus dense que l'os trabéculaire, ce qui lui confère la solidité nécessaire aux fonctions de protection et de support. Outre sa densité, l'os cortical tient sa solidité de sa configuration, organisée selon des lignes de forces. La taille, la forme et l'épaisseur de l'os corticale rendent compte de la résistance mécanique de cet os qui constitue principalement la diaphyse des os longs. L'os trabéculaire ou spongieux est un tissu plus aéré, dont la structure tridimensionnelle

en réseau de trabécules lui confère une structure plus poreuse que l'os cortical et une surface de contact avec la moelle osseuse adjacente plus importante, d'où son implication principale dans le métabolisme du calcium. L'os trabéculaire est principalement retrouvé dans la structure des épiphyses et métaphyses des os longs, ainsi que dans celle des corps vertébraux. Ces 2 types d'os ont une microstructure bien organisée, lamellaire.

Au niveau microscopique, l'os est composé d'une matrice organique solidifiée par le dépôt de sels de calcium. La partie organique est formée à partir d'environ 95% de collagène de type I. Les 5% résiduels comportent des protéoglycans et de nombreuses protéines non collagéniques (ostéocalcine, ostéopontine, sialoprotéines osseuses...). Les sels qui minéralisent la matrice osseuse sont principalement constitués de calcium et de phosphore qui forment des cristaux d'hydroxyapatite (Marks, 2003).

1.1.2 Le remodelage osseux

Le squelette est un organe très actif métaboliquement par son constant remodelage osseux, processus physiologique permanent et continu chez l'adulte. Le remodelage osseux implique la résorption de l'os par les ostéoclastes suivie par la formation de la matrice osseuse par les ostéoblastes. La masse osseuse est dépendante de la balance entre la résorption et la formation osseuse (Riggs & Parfitt, 2005).

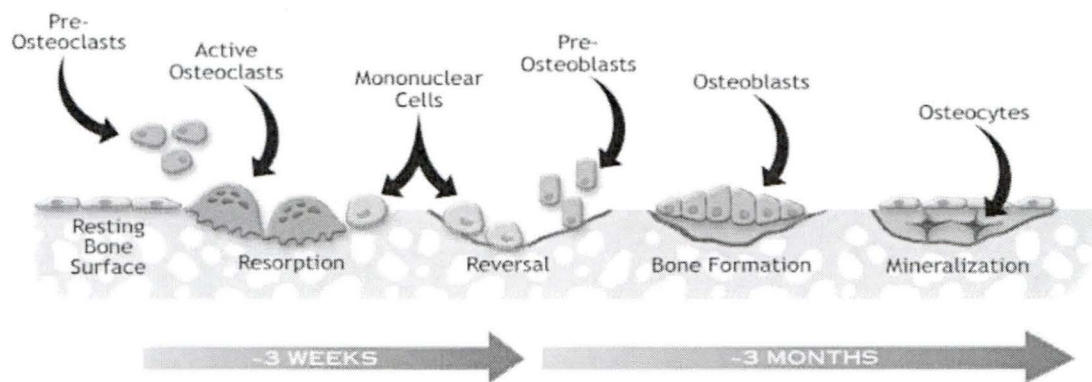


Figure 1 : Le remodelage osseux

Le remodelage osseux est divisé en 3 grandes étapes comprenant la résorption de l'os par les ostéoclastes, l'étape d'inversion par des cellules mononucléées et la formation osseuse par les ostéoblastes. Ces étapes sont encadrées de phases de quiescence. (Michigan, 2005)

Le remodelage osseux peut se diviser en trois grandes étapes : la résorption osseuse, l'étape intermédiaire et la formation osseuse (Figure 1). Ce cycle débute par la phase de résorption caractérisée par la migration et la différenciation des précurseurs ostéoclastiques aux sites de résorption. Les ostéoclastes pleinement différenciés résorbent l'os à une vitesse approximative de 25 μm /jour en effectuant des tranchées de 40-60 μm . Suite à la formation de la lacune de résorption, ces ostéoclastes entrent en apoptose pour être éliminés. Les ostéoclastes sont remplacés par des cellules mononucléées à la surface de la lacune dans la phase intermédiaire. Ces cellules préparent la surface de l'os et servent de signal pour le recrutement et la différenciation des ostéoblastes qui produisent la nouvelle matrice osseuse qui sera secondairement minéralisée. Lorsque cette étape de formation osseuse est complétée, une couche de cellules recouvre la surface de l'os, appelées cellules bordantes et dérivées des ostéoblastes. Certaines cellules ostéoblastiques resteront incluses au sein dans la matrice osseuse et constituent les ostéocytes. La résorption osseuse est d'une durée d'environ 2 à 3 semaines alors que la formation osseuse peut s'étendre jusqu'aux 4 mois suivants (Hadjidakis & Androulakis, 2006).

Une notion fondamentale est le couplage dans le temps et dans l'espace entre la résorption osseuse et la formation osseuse aboutissant au remplacement de l'os ancien par de l'os nouveau avec une restitution « ad integrum » de l'os, permettant d'assurer l'homéostasie osseuse. Une régulation très étroite du remodelage osseux est donc nécessaire, et est assurée par plusieurs médiateurs. Il peut y avoir une régulation systémique par différentes hormones comme la parathormone (PTH), la calcitonine

et les estrogènes par exemple. Des médiateurs locaux comme le RANKL (Receptor Activator of NF- κ B), l'ostéoprotégérine (OPG) et le TGF- β viennent aussi réguler le remodelage osseux. L'importance et la complexité du remodelage osseux et de sa régulation, en font un sujet d'étude d'importance majeure, car une perte du contrôle de cette balance résorption/formation osseuse peut entraîner le développement de pathologies osseuses comme l'ostéoporose.

1.2 Les cellules osseuses

1.2.1 Les ostéoblastes

Les ostéoblastes (Ob) sont responsables de la formation osseuse, par la sécrétion des protéines matricielles qui sont nécessaire pour la minéralisation osseuse. (Figure 2-B). Les ostéoblastes sont des cellules mononucléées dérivant des cellules souches mésenchymateuses. De nombreux facteurs locaux et systémiques tels que TGF- β , FGF, BMPs, PTH, 1,25 vitamine D et les estrogènes stimulent la différenciation ostéoblastique et l'activité des ostéoblastes. En plus, plusieurs facteurs de transcription sont impliqués dans ces processus, parmi lesquels Runx2 (Cbfa1) joue un rôle fondamental.

Le principal gène ostéogénique pour la différenciation des ostéoblaste et la formation osseuse est de Runx2, codant pour un facteur de transcription ayant de multiples activités régulatrices, dont l'activation ou la répression de nombreux

gènes (collagène de type I alpha, l'ostéopontine et l'ostéocalcine (Marie, 2008)), et l'intégration de signaux biologiques provenant des voies BMP/TGF- β , et de la voie de signalisation Wnt.

Plusieurs systèmes de signalisation jouent des rôles importants pendant le développement de l'ostéoblaste, et la voie Wnt est particulièrement critique dans la formation osseuse. Les protéines Wnt se lient à un complexe récepteur composé d'un « frizzled » récepteur couplé à une protéine G, et un co-récepteur, LRP5/6.

La voie de signalisation Wnt induit une cascade d'évènements intracellulaires qui stabilisent la β -caténine, facilitant son transport au noyau où elle se lie à des facteurs de transcription et modulant ainsi l'expression de gènes qui favorisent l'expansion des ostéoblastes et leurs fonctions.

Les antagonistes physiologiques de Wnt, Dickkopfs (dkk1), «secreted frizzled-related proteins» (sFRP1), ou la sclérostine, affectent l'activation de ce complexe, et inhibent la formation osseuse.

Suite à la formation du nouvel os, l'ostéoblaste entre en apoptose ou il se différencie en ostéocyte. Ceci est suivi par le recrutement d'autres précurseurs ostéoblastiques pour former une nouvelle couche d'os et recouvrir les ostéocytes (Huang *et al.*, 2007).

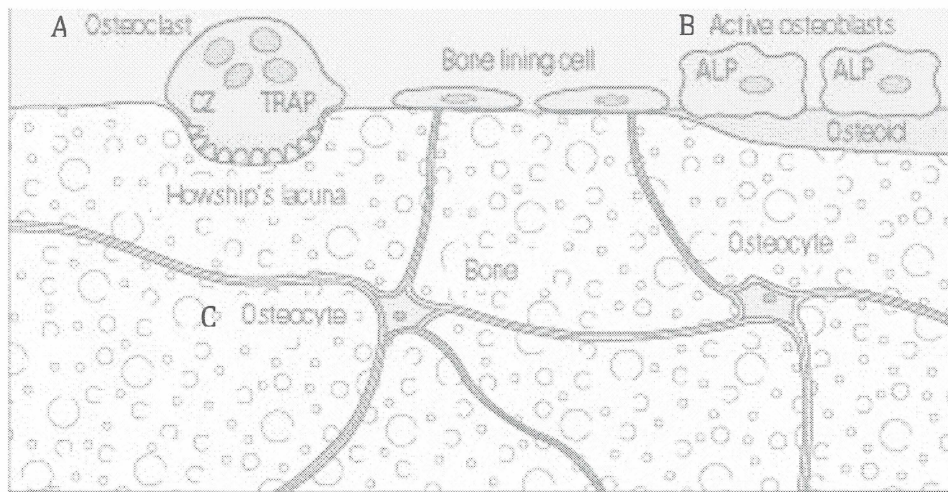


Figure 2 : Les cellules osseuses.

A) Les ostéoclastes sont des cellules multinucléées provenant de cellules souches hématopoïétiques. Suite à leur différenciation induite par le M-CSF et le RANKL, ces cellules résorbent l'os et forment une lacune de résorption. B) Les ostéoblastes sont d'origine mésenchymateuse et leur différenciation est modulée par de nombreux facteurs dont le TGF β et les BMPs 2/4/7. Ces cellules sécrètent la matrice osseuse formée principalement de collagène de type I et permettent la minéralisation de la matrice pour former l'os. C) Les ostéocytes sont des ostéoblastes qui ont été emprisonnés par leur propre production de matrice osseuse. Ils forment un large réseau d'expansions cytoplasmiques contenues dans des canalicules qui permettent une communication de l'intérieur vers l'extérieur de l'os et interviennent dans la régulation du remodelage osseux (Hochberg, 2003).

1.2.2 Les ostéocytes

Les ostéocytes correspondent à environ 90 % des cellules contenues dans l'os, ce qui en fait la plus grande population de cellules dans ce tissu. Comme il a été mentionné dans la section 2.1, les ostéocytes sont des ostéoblastes emprisonnés dans la matrice osseuse et ayant subi une différenciation subséquente. Les mécanismes par lesquels les ostéoblastes se différencient en ostéocytes sont méconnus à ce jour. La morphologie des ostéocytes est caractérisée par de grandes expansions cytoplasmiques liant d'autres ostéocytes ou les cellules à la surface de l'os (Figure 2-C). Les jonctions communicantes sont fréquemment impliquées lors de ces liaisons cellules-cellules. Ce réseau de dendrites forme des canalicules dans la matrice osseuse ce qui permet une communication entre l'intérieur et l'extérieur de l'os (Hochberg, 2003). En effet, les ostéocytes permettent de réguler le remodelage osseux en augmentant la libération de facteurs ostéoblastogéniques ou de facteurs ostéoclastogéniques (Marks, 2003).

Les ostéocytes sont responsables en particulier de la production de sclérostine, un antagoniste naturel de la voie Wnt et de FGF23, impliqué dans le processus de minéralisation et dans l'homéostasie du phosphore (Noble, 2008).

1.2.3 Les ostéoclastes

Les ostéoclastes (A sur la figure 2) sont de volumineuses cellules multinucléées formées par la fusion cytoplasmique de précurseurs mononucléés hématopoïétiques. L'ostéoclastogénèse débute par le recrutement des précurseurs myéloïdes de la moelle osseuse au site de résorption (Teitelbaum & Ross, 2003).

1.2.3.1 Formation ostéoclastique

Comme les macrophages, les ostéoclastes dérivent des CFU-GM. Le facteur de croissance M-CSF induit la prolifération et la survie des précurseurs ostéoclastiques par liaison à son récepteur c-Fms ce qui active la phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K). De plus, le M-CSF augmente l'expression de RANK à la surface des précurseurs ostéoclastiques. RANK est le récepteur de RANKL, facteur exprimé par les ostéoblastes et les cellules stromales dans le microenvironnement osseux. Comme le M-CSF, RANKL est indispensable à l'induction et aux différentes étapes de la différenciation ostéoclastique (Boyce & Xing, 2007).

Après une première phase de prolifération, indispensable pour que la différenciation puisse survenir, les précurseurs ostéoclastiques mononucléés fusionnent entre eux, et acquièrent progressivement les caractéristiques des ostéoclastes multinucléés. Les marqueurs ostéoclastiques apparaissent (TRAP, CTR,

intégrine $\alpha_v\beta_3$) et les marqueurs macrophagiques disparaissent (NSE, Mac-1). Différents facteurs locaux et hormonaux interviennent dans le processus de différenciation (Section 1.2.3.3), qui se termine par l'acquisition de la fonction de résorption osseuse, principale caractéristique phénotypique des ostéoclastes (Boyle *et al.*, 2003).

1.2.3.2 L'ostéoclaste mature et son fonctionnement

L'ostéoclaste mature possède une morphologie caractéristique (Figure 3). C'est une cellule polarisée avec en regard de la surface osseuse une différenciation de la membrane plasmique constituant la membrane plissée entourée d'une zone de scellement permettant d'individualiser le compartiment de résorption osseuse sous l'ostéoclaste. La zone de scellement est constituée d'une large bande de F-actine (largeur de 4 μm) et d'une fine couche intérieure et extérieure de vinculine. L'actine lie l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et permet la liaison de l'ostéoclaste à la matrice osseuse (Saltel *et al.*, 2008). La membrane plissée est le lieu de sécrétion d'ions H^+ par l'intermédiaire d'une pompe à protons ATPasique qui acidifient le compartiment de résorption, et d'enzymes protéolytiques (Cathepsine K, métalloprotéases). De nombreux canaux ioniques sont également exprimés à la surface de l'ostéoclaste pour maintenir l'homéostasie et l'électroneutralité de la cellule (Bruzzaniti & Baron, 2006). La région centrale de la membrane plissée comporte une zone d'endocytose des produits de dégradation de la matrice extracellulaire qui seront relargués dans l'environnement de l'ostéoclaste à son pôle basal (Mulari *et al.*, 2003). La membrane

basolatérale permet un contact avec l'extérieur de la cellule. Elle contient plusieurs récepteurs comme le CTR, le RANK, le récepteur du M-CSF, des récepteurs sensibles au calcium et au pH, ainsi que certains récepteurs de cytokines (IL-1, IL-6 et le TNF), des récepteurs pour les intégrines et même des récepteurs de mort (Dei Fattore *et al.*, 2008) (Roux *et al.*, 2005).

Après la résorption osseuse, certains signaux, comme le calcium extracellulaire, entraînent une réorganisation du cytosquelette induisant la migration de l'ostéoclaste vers une partie d'os intacte. L'ostéoclaste résorbe l'os et migre de nouveau et cela, pendant quelques cycles. La résorption se termine suite à l'arrêt de la stimulation de l'ostéoclaste et à l'intervention de signaux négatifs conduisant à l'apoptose de la cellule (Roodman, 2006).

1.2.3.3 Régulation de la formation et de l'activité de l'ostéoclaste

Les interactions entre RANKL et RANK sont fondamentales pour la différenciation, l'activité et la survie des cellules ostéoclastiques. Le M-CSF est également indispensable pour la différenciation et la survie de ces cellules. Ces deux médiateurs sont exprimés par les ostéoblastes et les cellules stromales présents dans l'environnement de l'os. RANKL est un membre de la famille du TNF et est exprimé sous forme transmembranaire ou sous forme soluble (Boyce & Xing, 2007).

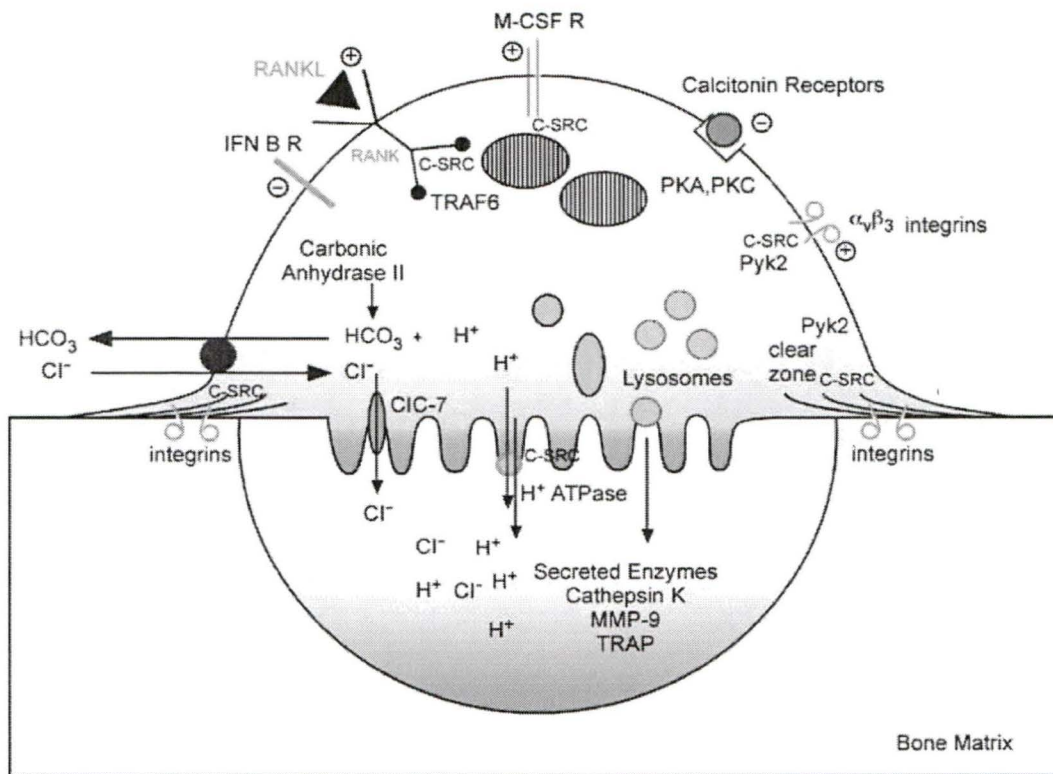


Figure 3 : L'ostéoclaste mature

Représentation d'un ostéoclaste mature comprenant, à la surface de l'os, la membrane plissée entourée par la zone de scellement. À la surface opposée, se retrouvent les canaux ioniques pour le maintien de l'homéostasie et les récepteurs permettant la régulation de l'ostéoclaste (Bruzzaniti & Baron, 2006).

L'ostéoprotégérine (OPG) exprimée par les ostéoblastes appartient à la famille des récepteurs du TNF. C'est un récepteur soluble pour RANKL. Ce récepteur leurre empêche l'interaction du RANKL avec son récepteur membranaire RANK inhibant ainsi la formation et l'activité des ostéoclastes. Le ratio entre le RANKL et l'OPG peut être modulé par différents facteurs. Il reflète la capacité des ostéoblastes à induire la formation et l'activité des ostéoclastes, et donc le niveau de résorption osseuse (Boyce & Xing, 2008). Les hormones PTH, vitamine D₃, les cytokines IL-11, IL-1 α et β , TNF- α , IL-17 ou encore la PGE₂ augmentent l'expression de RANKL dans les ostéoblastes et les cellules stromales. L'expression de l'OPG est diminuée par le PGE₂ et augmentée par les estrogènes. Tous les facteurs qui modulent la résorption osseuse agissent ainsi par cette voie effectrice commune impliquant RANKL et OPG (Roux & Orcel, 2000). Certains facteurs pourraient en outre stimuler la différenciation ostéoclastique indépendamment de RANKL, comme l'IL-1 ou le TNF α .

L'importance de la voie RANKL/RANK/OPG a été soulignée par les modèles de souris transgéniques qui surexpriment ou sont déficitaires en un de ces facteurs. Les souris transgéniques qui surexpriment l'OPG développent une ostéopétrose caractérisée par un défaut de la différenciation ostéoclastique. Les souris transgéniques déficientes en OPG développent une ostéoporose sévère avec une augmentation de la différenciation et de l'activité des ostéoclastes. De même, les souris KO pour RANKL ou RANK développent une ostéopétrose (Ren *et al.*, 2006) tandis qu'une surexpression de RANKL induit un phénotype ostéoporotique.

1.2.3.4 Voies de signalisations impliquées dans la différenciation et l'activation des ostéoclastes

Dans les dix dernières années, de grands progrès ont été réalisés dans la compréhension des voies de signalisation impliquées dans la différenciation et l'activation des ostéoclastes par le RANKL. La liaison du RANKL à son récepteur sur les précurseurs ostéoclastiques ou les ostéoclastes matures mène à la transduction de multiples signaux intracellulaires.

L'étape initiale, qui est la clé de voûte de la signalisation RANK, est la liaison des facteurs TRAFs (facteurs cytoplasmiques associés aux récepteurs TNF) à des domaines spécifiques du domaine cytoplasmique de RANK. TRAF-2, -5 et -6 se lient à RANK, mais seule TRAF-6 semble jouer un rôle fonctionnel dans cette signalisation. TRAF-6 agit comme une molécule adaptatrice clé pour assembler les protéines de signalisation qui vont conduire à l'activation de facteurs de transcription dont les principaux sont NF- κ B et NFATc1, et diriger l'expression des gènes spécifiques des ostéoclastes, entraînant leur différenciation et activation.

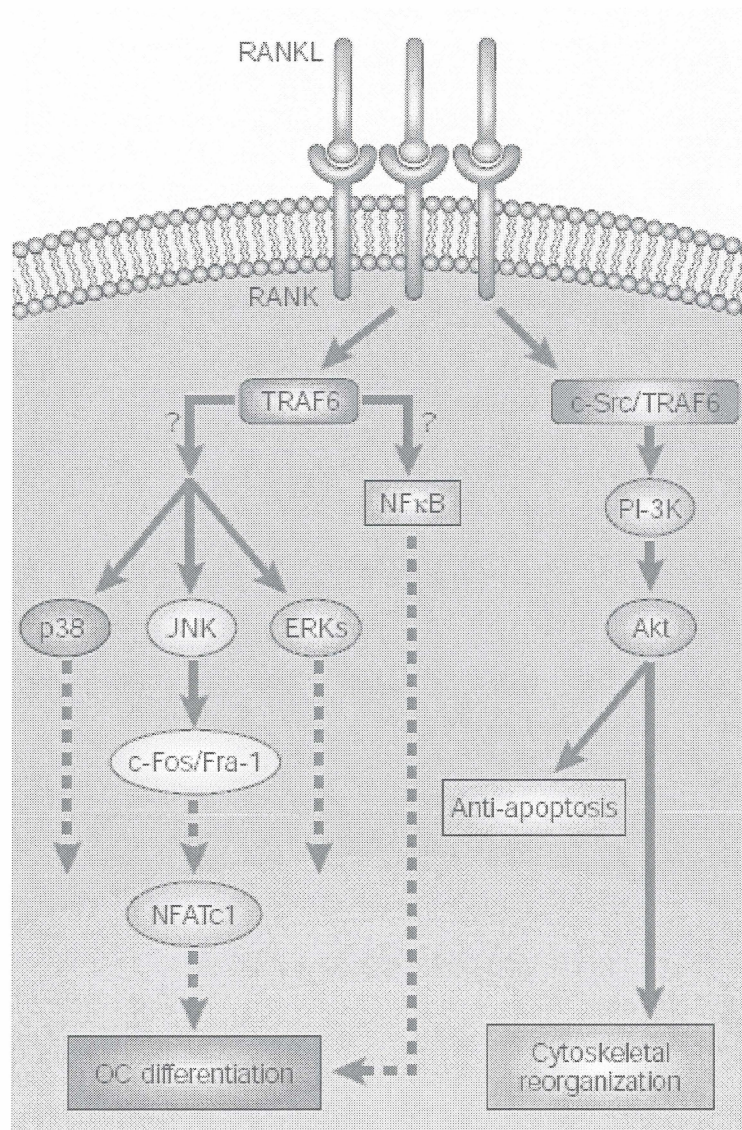


Figure 4 : Signalisation dans l'ostéoclaste après stimulation par RANKL

Suite à l'activation du récepteur RANK par son ligand, différentes voies de signalisation sont activées, conduisant à l'activation de facteurs de transcription dont les 2 principaux sont NF-κB et NFATc1. Ces activations mènent à la modulation de gènes impliqués dans la formation, l'activité et la survie des ostéoclastes. D'autres voies sont impliquées en particulier celles des MAPK. L'activation de PI-3K et AKT via C-src et TRAF-6 protège contre l'apoptose, et est impliquée dans l'organisation du cytosquelette (Teitelbaum & Ross, 2003).

Le facteur de transcription NF- κ B forme un dimère à partir de cinq protéines : Rel, RelA (p65), RelB, NF-kappaB1 (p50) et NF-kappaB2 (p52). Les isoformes p50 et p52 sont les principales protéines impliquées dans l'ostéoclastogénèse. Le rôle fondamental de NF- κ B dans la différenciation ostéoclastique avait été mis en évidence par la réalisation de souris double KO pour les sous-unités p50 et p52 de NF- κ B. Ces souris double KO développent une ostéopétrose liée à un défaut de différenciation ostéoclastique. En absence de stimulation, NF- κ B est séquestré dans le cytoplasme du fait de sa liaison à I κ B. Lors d'une stimulation par RANKL, la phosphorylation de I κ B par IKK induit sa dégradation, libérant le dimère de NF- κ B et permettant sa translocation du cytoplasme au noyau où il modulera l'expression de gènes cibles (Asagiri & Takayanagi, 2007). Le schéma global des actions du RANKL lors de l'ostéoclastogénèse est présenté dans la figure 4.

NFATc1 est un autre facteur de transcription d'importance majeure dans l'ostéoclaste. RANKL induit l'expression du gène de NFATc1 et active NFATc1 via le calcium intra-cellulaire. L'activation de la voie RANKL/NF- κ B stimule également l'expression de NFATc1. NFATc1 est impliqué dans la modulation de nombreux gènes essentiels à la différenciation et au fonctionnement de l'ostéoclaste (Asagiri & Takayanagi, 2007). TRAF-6 permet le recrutement et l'activation des MAPK (JNK, p38) lors de la transduction de signal du RANKL. Les MAPK permettent l'activation du facteur de transcription AP-1 (Fos/Jun) qui est impliqué dans la différenciation, avec un rôle majeur comme le suggère les souris KO pour c-Fos qui développent une

ostéopétrose avec une absence complète de différenciation ostéoclastique (Asagiri & Takayanagi, 2007).

1.3 L'apoptose

L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, est caractérisée par des changements morphologiques de la cellule comportant une hypercondensation de la chromatine, un clivage internucléosomique de l'ADN et une réorganisation du cytosquelette menant à la formation de corps apoptotiques. Ces corps apoptotiques sont phagocytés par les cellules environnantes et ainsi éliminés pour éviter une réaction inflammatoire. L'apoptose est un processus essentiel de protection contre les cellules endommagées et d'homéostasie tissulaire maintenant le nombre de cellules et la taille du tissu (Chowdhury *et al.*, 2006). Le rôle de l'apoptose est souvent mis en premier plan dans certaines pathologies où des gènes inhibiteurs de l'apoptose ont été identifiés comme oncogène, un défaut d'apoptose entraînant la perte du contrôle de l'homéostasie tissulaire et facilitant la prolifération tumorale (Polsky & Cordon-Cardo, 2003). La perte osseuse liée à la carence estrogénique ou la destruction osseuse secondaire à l'inflammation articulaire sont en partie contrôlées par un défaut de l'apoptose des ostéoclastes (Xing & Boyce, 2005). Ces données suggèrent l'importance de connaître les mécanismes régissant et contrôlant l'apoptose des ostéoclastes en particulier.

1.3.1 Mécanismes de l'apoptose

Deux voies permettent l'induction de l'apoptose, une voie extrinsèque activée par la liaison de ligands externes sur des récepteurs de mort exprimés à la surface des cellules, et une voie intrinsèque ou mitochondriale déclenchée lors d'un stress cellulaire. Les caspases sont les effecteurs communs à ces 2 voies.

1.3.1.1 Les caspases

L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, est par définition un processus contrôlé impliquant l'activation de voies biochimiques précises dont les caspases sont les effecteurs. Les caspases représentent une famille de cystéine-protéases capables de cliver d'autres protéines à des sites consensus spécifiques. Les caspases sont classées en trois catégories : les caspases inflammatoires, les caspases initiatrices et les caspases effectrices (Lavrik *et al.*, 2005). Les caspases inflammatoires sont essentielles dans la maturation de l'IL-1 β et IL-18 (Nadiri *et al.*, 2006) tandis que les deux autres catégories sont impliquées dans l'apoptose.

Les caspases sont des zymogènes, c'est-à-dire des enzymes inactives nécessitant un changement biochimique pour leur activation. Les caspases inactives ou procaspases possèdent trois domaines : 2 sous-unités catalytiques (p10 et p20) et un prodomaine N-terminal contenant des motifs structuraux appartenant à la superfamille des « domaines de mort ». Ces « domaines de mort » se retrouvent sur

les procaspases inflammatoires et les caspases initiatrices et permettent le recrutement d'autres procaspases par des interactions homotypiques. Nous retrouvons deux types de domaines de mort : les DED (Death Effector Domain) présents dans les caspases initiatrices de la voie extrinsèque, et les CARD (Caspase Recruitment Domain) pour les autres procaspases. L'activation des procaspases débute par l'association de deux procaspases via leur domaine de mort, suivie d'une autoprotéolyse des domaines catalytiques menant à la formation d'un hétérotétramère de deux p10 et de deux p20 tel que représenté sur la figure 5 (Lavrik et al., 2005). Les caspases activées poursuivent la cascade apoptotique par le clivage de différents substrats.

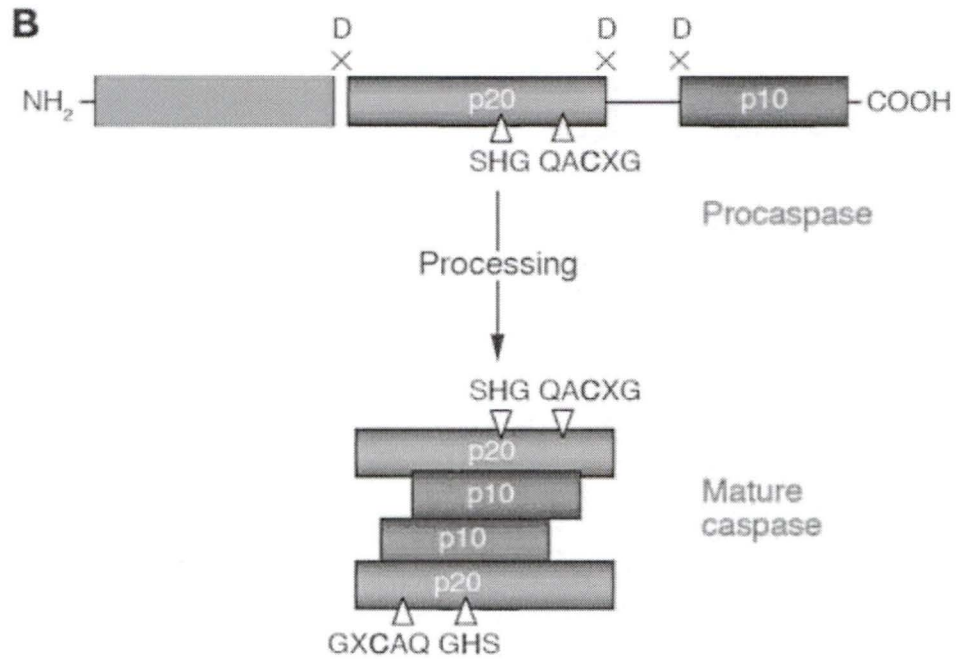


Figure 5 : Activation des caspases

Les procaspases comprennent 3 sous-unités : les deux sous-unités catalytiques et le prodomaine N-terminal. Suite à leur autoprotéolyse, il y a clivage des deux sous-unités catalytiques et formation de la caspase active comportant 2 petites et 2 grandes sous-unités catalytiques (Lavrik et al., 2005).

1.3.1.2 La voie extrinsèque

L'organisme a développé plusieurs mécanismes permettant l'élimination des cellules indésirables par apoptose. Un de ces mécanismes implique la liaison d'un ligand de mort externe à son récepteur à la surface cellulaire et correspond à la voie extrinsèque. Les récepteurs pouvant mener à l'activation de l'apoptose font partie de la superfamille des récepteurs du TNF. Ces récepteurs sont caractérisés par un domaine intracellulaire appelé «death domain» (DD). Les principaux «récepteurs de mort» sont le FAS (CD95), les récepteurs de TRAIL (TRAILR) et du TNF (TNFR) (Schulze-Osthoff *et al.*, 1998, Wang *et al.*, 2005).

L'induction de l'apoptose par cette voie débute par la liaison du ligand à son récepteur à la surface cellulaire ce qui entraîne la formation d'un trimère de récepteurs. La formation de ce trimère mène au recrutement d'une protéine adaptatrice, appelée FADD, par le DD retrouvé sur le domaine intracellulaire du récepteur et sur la protéine adaptatrice. Cette protéine adaptatrice possède un autre domaine, le «death effector domaine» (DED) qui se retrouve aussi sur les caspases 8 et 10. À l'aide du domaine DED, il y a recrutement des procaspases 8 ou 10 permettant un rapprochement favorable à l'autoprotéolyse nécessaire à l'activation des caspases. Les caspases initiateuses (caspases 8 ou 10) ainsi activées peuvent alors à leur tour activer les caspases effectrices (caspases 3/6/7). Les caspases effectrices activées lient et clivent leurs substrats induisant ainsi les changements de morphologie spécifiques de l'apoptose (Wang *et al.*, 2005).

La caspase 8 activée peut aussi cliver la protéine Bid de la famille des protéines homologues Bcl-2. Le clivage de Bid mène à l'activation de la voie intrinsèque de l'apoptose qui sera discutée dans la prochaine section (Lavrik et al., 2005).

1.3.1.3 La voie intrinsèque

La voie intrinsèque ou mitochondriale est activée lors d'un débalancement de l'homéostasie de la cellule, dont les causes sont nombreuses : stress oxydatifs, dommages cellulaires ou génomiques trop importants pour la viabilité de la cellule, et la perte de stimulation des voies de survie en sont les principales (Green & Kroemer, 2005).

La voie d'apoptose intrinsèque requiert une perméabilisation de la mitochondrie conduisant à la libération du cytochrome *c* (Cyt_c) dans le cytosol. Les protéines responsables de l'intégrité de la mitochondrie sont les protéines de la famille des homologues Bcl-2. Les membres de la famille Bcl-2 se caractérisent par leurs domaines BH (Bcl-2 homology), dont 4 ont été décrits (BH1, BH2, BH3, BH4). Ils sont divisés en deux catégories : ceux induisant l'apoptose (pro-apoptotiques) et ceux inhibant l'apoptose (anti-apoptotiques). Les protéines pro-apoptotiques se subdivisent en deux groupes : les protéines de la famille Bax contenant plusieurs domaines BH (BH1, BH2, BH3) et les protéines ne contenant qu'un seul groupe BH3

(famille BH3-only). Les protéines anti-apoptotiques contiennent les 4 domaines BH (Figure 6) (Kuwana & Newmeyer, 2003). La perméabilisation de la mitochondrie par des pores est due aux protéines pro-apoptotiques à plusieurs domaines (Bax, Bak et Bok). Ces protéines sont exprimées constitutivement dans la cellule et permettent une activation constante de l'apoptose. Pour empêcher cette induction, les protéines anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-xL) inhibent l'action des protéines pro-apoptotiques à plusieurs domaines. La survie de la cellule résulte de l'équilibre entre les protéines anti- et les pro-apoptotiques. Lors d'une induction d'apoptose, la cellule augmente l'expression et l'activité des molécules pro-apoptotiques « BH3-only », qui agissent en amont des protéines de la famille Bax, à multiples domaines. Leur fonction est de lier les protéines anti-apoptotiques, prévenant ainsi l'inhibition de Bax et Bak. De plus, les protéines pro-apoptotiques « BH3-only » peuvent aussi directement activer Bax et Bak (Adams & Cory, 2007).

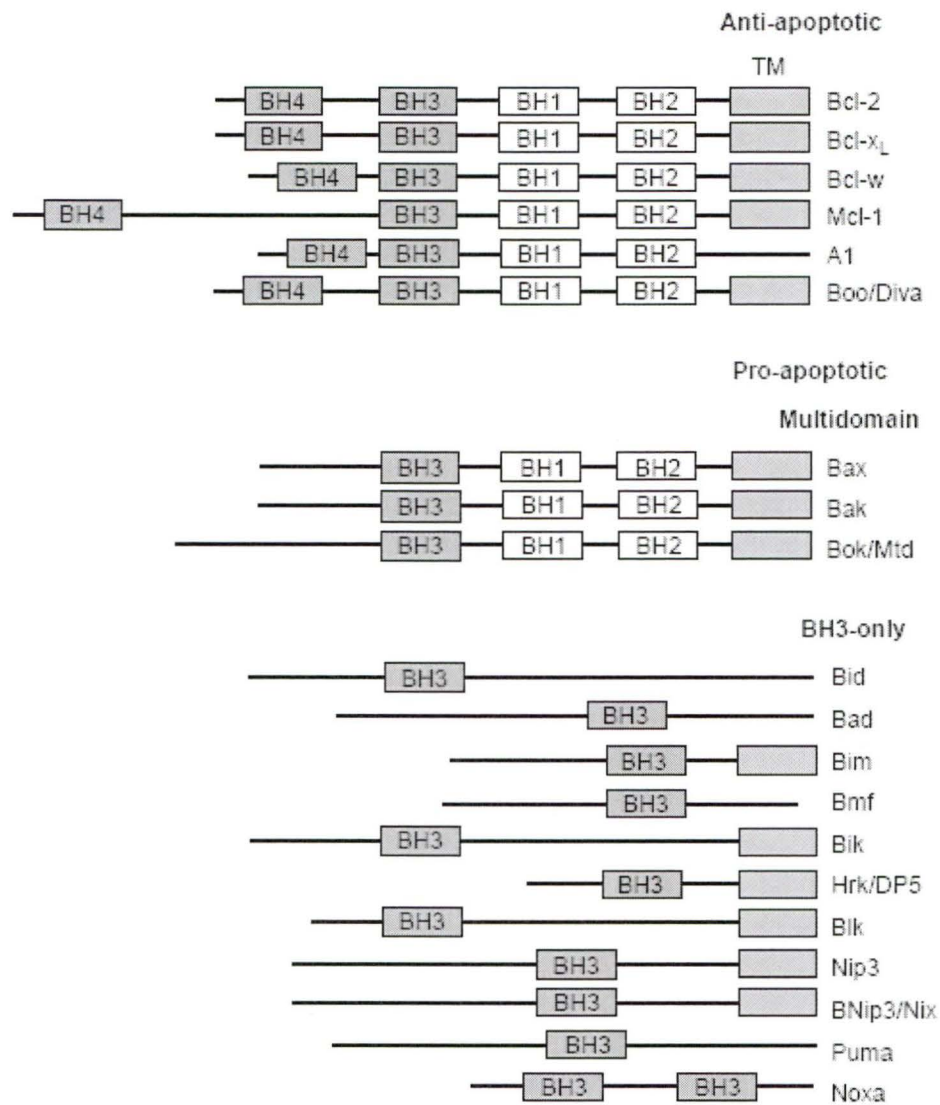


Figure 6 : Classification et composition des homologues Bcl-2

Classification des homologues Bcl-2 selon leur composition. Les homologues anti-apoptotiques contiennent les 4 sous-unités BH alors que les pro-apoptotiques n'ont pas de sous-unité BH4. Les pro-apoptotiques se divisent en deux catégories : les homologues exprimant 3 sous-unités BH3 et les homologues exprimant seulement le domaine BH3 (Kuwana & Newmeyer, 2003)

La perte de l'homéostasie de la cellule induit un changement du ratio entre les protéines pro et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. L'augmentation de l'activité des protéines pro-apoptotiques peut résulter d'une augmentation de leur expression ou de leur activation par clivage ou phosphorylation. Alors que l'activité des protéines pro-apoptotiques augmente, la formation de pores qui en résulte sur la membrane externe de la mitochondrie permet la libération dans le cytosol du Cyt c ainsi que d'autres protéines pouvant moduler l'activité des caspases (Bouchier-Hayes *et al.*, 2005). Le Cyt c se lie à la sous-unité WD40 de la protéine Apaf-1 induisant un changement de conformation de cette protéine. Ce changement libère la sous-unité CARD de Apaf-1 et permet l'assemblage de 7 protéines Apaf-1-Cyt c . Cet oligomère favorise le recrutement des procaspases 9 à l'aide du domaine CARD qui se retrouve aussi sur la procaspase 9. Ce complexe comprenant le Cyt c , Apaf-1 et la procaspase 9 se nomme l'apoptosome. Dans l'apoptosome, les procaspases 9 sont suffisamment rapprochées pour leur autoprotéolyse et ainsi former la caspase 9 active. Cette caspase active peut cliver les procaspases effectrices conduisant à leur activation.

1.3.1.4 Les caspases effectrices de l'apoptose

Les changements morphologiques de la cellule ne sont pas le résultat de l'action directe des caspases effectrices (caspases 3/6 et 7), mais font suite aux actions des caspases effectrices sur différentes enzymes ou protéines (Lavrik *et al.*, 2005). Ainsi, la dégradation internucléosomique de l'ADN se fait grâce au clivage de ICAD qui est une protéine inhibitrice de la DNase impliquée dans cette dégradation

(Nagata, 2000). Les caspases permettent le clivage et l'inactivation de l'enzyme PARP (poly(ADP-ribose) polymerase) impliqué dans la réparation de l'ADN (Heeres & Hergenrother, 2007). Le clivage de la gelsoline par les caspases effectrices permet une rapide dépolymérisation du cytosquelette d'actine (Silacci *et al.*, 2004). Ces quelques exemples illustrent l'action des caspases effectrices. L'ensemble des activations et inhibitions effectuées par les caspases mène à la dégradation de l'ADN et de protéines intracellulaires essentielles au fonctionnement de la cellule, et conduit à la formation de corps apoptotiques qui seront phagocytés par les macrophages environnants. Ceci permet une récupération de composantes cellulaires tout en évitant la lyse cellulaire qui pourrait induire une réaction inflammatoire.

1.3.2 La régulation de l'apoptose

Pour survivre, la cellule reçoit plusieurs signaux permettant d'inhiber la machinerie apoptotique. Les principaux signaux surviennent lors de la fixation de la cellule à la matrice extracellulaire par les intégrines et sous l'action de facteurs de croissance. En effet, ces signaux permettent l'activation de cascades de signalisation induisant l'activation des voies de PI3K/AKT et des ERKs. L'activation de ces voies permet d'augmenter l'expression des protéines anti-apoptotiques et de diminuer celle des protéines pro-apoptotiques. De plus, il a été démontré que ces kinases inhibaient certains homologues Bcl-2 pro-apoptotiques par régulation génique, par phosphorylation, par séquestration ou encore par épissage différentiel (Martin & Vuori, 2004). En l'absence de facteur de croissance ou lors d'une perte de contact

avec la matrice extracellulaire, les voies de survie ne sont plus activées entraînant l'augmentation de l'activité des protéines pro-apoptotiques déclenchant l'activation des voies d'apoptose.

L'apoptose peut aussi être induite lors d'un stress qui active les voies de p38 et de JNK. Un stress oxydatif ou une irradiation aux UV sont des exemples de stress possible pouvant mener à l'activation de ces voies. D'autres stimuli, comme le TGF- β , permettent l'activation de ces voies. Il a été proposé que l'induction de l'apoptose par JNK et p38 serait le résultat d'une inhibition de ERK. (Junttila *et al.*, 2008) D'autres travaux montrent que p38 et JNK augmentent l'activité de Bax et Bid ce qui entraîne la libération du cytochrome *c* de la mitochondrie suivie de l'apoptose (Sumbayev & Yasinska, 2005).

Lors de ces stress, l'ADN peut subir des dommages qui doivent être réparés pour le bon fonctionnement de la cellule. Le gardien du génome est la protéine p53 ayant pour fonction de détecter les problèmes au niveau de l'ADN et d'induire sa réparation. Si les dommages sont trop importants, p53 agit comme facteur de transcription pro-apoptotique. En effet, p53 peut induire l'expression de Bax et diminuer celle de Bcl-2. De plus, elle peut augmenter l'expression de Fas pour augmenter la sensibilité de la cellule au FasL (Chowdhury *et al.*, 2006).

D'autre part, une cellule endommagée peut aussi être reconnue par des cellules environnantes qui peuvent induire l'apoptose via la sécrétion de ligand pour

les récepteurs de mort. Ces médiateurs, principalement FasL et TRAIL, lient leur récepteur de mort respectif et induiront l'apoptose via la voie extrinsèque (Adrain & Martin, 2001).

Certaines protéines ont été identifiées par leur capacité à inhiber l'apoptose d'où leur nom de protéines inhibitrices d'apoptose (IAP, Inhibitors of Apoptosis). Leur expression est ubiquitaire dans tous les tissus adultes et foetaux. La structure des IAPs est similaire par leurs domaines «Baculovirus IAP Repeat» (BIR). Les IAPs inhibent l'apoptose à l'aide d'interaction avec les caspases en empêchant leur activation ou leur activité. Il existe plusieurs IAPs (XIAP, c-IAP1, c-IAP2, Survivin) capables d'inhiber les principales caspases initiateuses (8 et 9) et effectrices (3, 6 et 7) (Hunter *et al.*, 2007). L'expression génique des IAPs est étroitement régulée. L'activation de facteurs de transcription favorisant la survie cellulaire stimule la transcription de plusieurs IAPs. D'un autre côté, les IAPs peuvent être inhibées par certaines protéines libérées en même temps que le cytochrome c. Lors de la perméabilisation de la mitochondrie, il peut y avoir translocation des protéines Smac/DIABLO, Omi/HtrA2 et XAF-1 dans le cytosol et ces protéines peuvent inhiber directement l'activité des IAPs (Nachmias *et al.*, 2004).

1.3.3 Apoptose des ostéoclastes

Comme il a été mentionné dans la section 1.2.3.2, la résorption osseuse effectuée par les ostéoclastes est en partie contrôlée par leur apoptose. Dans cette section, nous verrons quels stimuli et quels mécanismes sont impliqués dans l'apoptose des ostéoclastes.

Le M-CSF, le RANKL, le TNF et l'IL-1 permettent d'activer les facteurs de transcription nécessaires à la survie de l'ostéoclaste (NF- κ B, NFATc1, c-Fos et PU.1). L'augmentation de l'expression de Bcl-2, de Bcl-xL et de XIAP par ces facteurs de transcription permet la survie des ostéoclastes. En l'absence de ces facteurs, le niveau d'expression de Bim est augmenté ce qui favorise l'apoptose par la voie intrinsèque. Les voies de survie (PI3K/AKT et ERK) sont activées par ces facteurs de croissance et par les intégrines qui permettent l'adhésion de la cellule à la surface de l'os. Cette activation mène à la phosphorylation de la protéine Bad et de la caspase 9 prévenant l'activation de la cascade apoptotique (Tanaka *et al.*, 2006). De plus, la phosphorylation de la MAPK p38 par l'IL-1 β permet d'augmenter la survie de l'ostéoclaste ce qui suggère que p38 pourrait être impliquée dans la survie de l'ostéoclaste (Yamashita *et al.*, 2008). Des facteurs endogènes comme la PTH et la 1,25(OH) $_2$ vitamine D $_3$ préviennent l'apoptose en stimulant l'expression de RANKL et en diminuant celle de l'OPG par les cellules stromales (Xing & Boyce, 2005).

D'un autre côté, plusieurs facteurs induisent directement l'apoptose des ostéoclastes. Les estrogènes sont de puissants inducteurs de l'apoptose des ostéoclastes, mais leurs mécanismes d'action à ce niveau ne sont pas clairement définis. Il a été proposé que les estrogènes pourraient augmenter la sensibilité des ostéoclastes à l'apoptose en augmentant le ratio Bax : Bcl-2 (Saintier *et al.*, 2006) ou en augmentant l'expression de FasL et du TGF- β par les ostéoblastes (Hughes *et al.*, 1996, Krum *et al.*, 2008). Depuis quelques années, plusieurs travaux ont montré l'implication du TRAIL dans l'apoptose des ostéoclastes. Tout a débuté en 2005 par la démonstration d'une expression des récepteurs de TRAIL à la surface des ostéoclastes et de leur implication dans l'apoptose de ces cellules (Roux *et al.*, 2005). Depuis, d'autres travaux ont aussi montré l'implication du TRAIL dans l'apoptose des ostéoclastes en activant la voie extrinsèque (Brunetti *et al.*, 2007, Colucci *et al.*, 2007). FasL et TGF- β permettent aussi d'induire l'apoptose des ostéoclastes (Roux *et al.*, 2005). Certains agents pharmacologiques comme les bisphosphonates, molécules utilisées pour leurs propriétés anti-résorptives dans le traitement de la maladie de Paget et dans l'ostéoporose, induisent fortement l'apoptose des ostéoclastes (Hughes & Boyce, 1997). A ce jour, les mécanismes impliqués dans l'apoptose des ostéoclastes sont incomplètement compris et constituent un champ d'intérêt majeur pour de futures études dans le domaine de l'os.

1.4 Le Transforming Growth Factor- β

Les mécanismes impliqués dans l'induction de l'apoptose des ostéoclastes par le TGF- β ne sont actuellement pas connus. Cet aspect représente une des thématiques du travail de maîtrise rapporté ici, ce pourquoi nous présenterons à ce stade les connaissances actuelles sur le rôle du TGF- β dans le tissu osseux.

Les actions du TGF- β sont multiples et ce facteur de croissance a été impliqué dans des processus aussi variés que la prolifération cellulaire, la différenciation, l'apoptose, la migration, la production de matrice extracellulaire et l'angiogénèse (Rahimi & Leof, 2007). Le TGF- β est le chef de file d'une famille comprenant les trois isoformes du TGF- β , les "Bone morphogenic protein" (BMPs), l'activine, l'inhibine et l'hormone anti-Mullerian. Dans l'os, l'isoforme 1 du TGF- β (TGF- β 1) est la plus abondante et il s'agit d'un important régulateur des ostéoblastes et des ostéoclastes (Fox & Lovibond, 2005).

1.4.1 La production et la maturation du TGF- β dans l'os

La production du TGF- β 1 débute par la synthèse du pré-pro- TGF- β 1 comprenant 390 acides aminés formant trois domaines distincts : le peptide signal (SP), le peptide latent associé (LAP) et le peptide mature. Par la suite, deux pré-pro- TGF- β 1 vont former un dimère secondairement clivé par la furine entre le peptide mature et le LAP. Un complexe est alors formé, le petit complexe latent (SLC)

associé au peptide mature. La liaison de la protéine de liaison du TGF- β latent (LTBP) avec le SLC mène à la formation du grand complexe latent (LLC) (Gentry *et al.*, 1988) (Figure 7). Le TGF- β 1 est sécrété par les ostéoblastes lors de la synthèse de la matrice osseuse et reste contenu dans celle-ci (Dallas *et al.*, 1994).

Lors de la résorption osseuse par les ostéoclastes, le TGF- β 1 est libéré de la matrice osseuse pour se retrouver dans le micro-environnement de l'os. L'action des protéases produites par l'ostéoclaste permet le clivage du TGF- β 1 latent (LTBP) qui se fixe à la matrice osseuse pour permettre la libération du SLC. Le seul mécanisme qui ait été proposé pour expliquer l'activation du TGF- β 1 implique le milieu acide produit par l'ostéoclaste. En effet, l'acidification du milieu pourrait mener à la rupture du lien non-covalent entre le LAP et le TGF- β 1 mature permettant ainsi la libération du TGF- β 1 mature pour qu'il puisse agir sur les cellules environnantes (Janssens *et al.*, 2005).

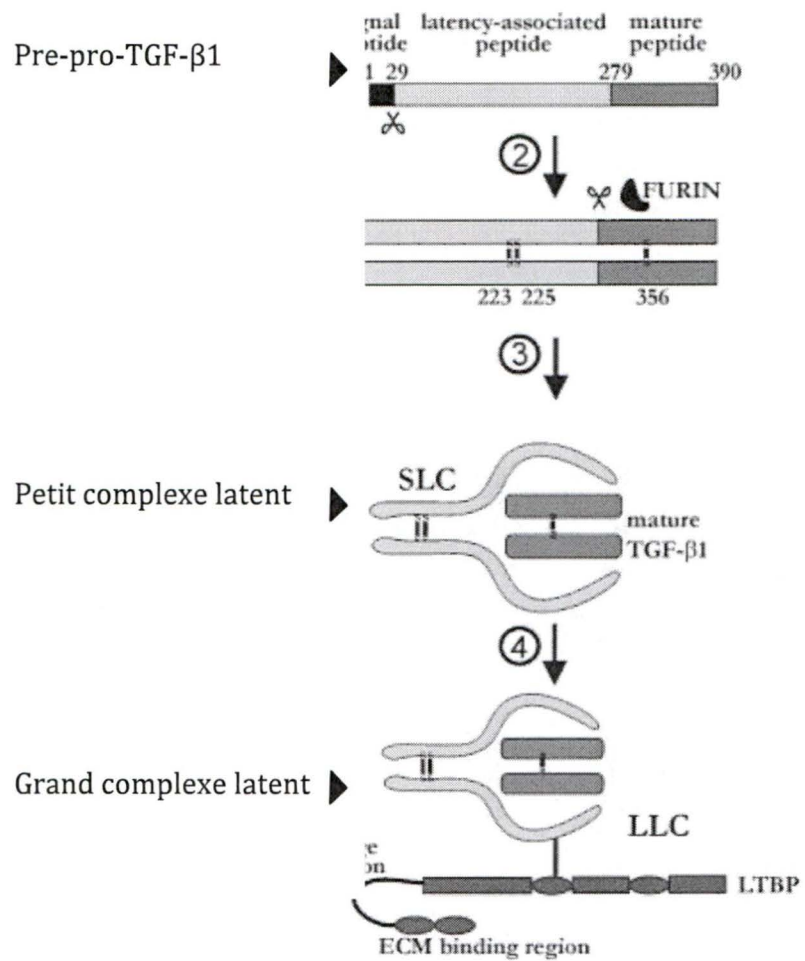


Figure 7 : Synthèse du TGF-β

La synthèse débute par la production du pré-pro- TGF-β1. Suite au clivage du LAP par la furine, il y a formation du petit complexe latent (SLC) et suite à la liaison du LTBP, il y a la formation du grand complexe latent (Janssens et al., 2005).

1.4.2 La signalisation du TGF- β 1

Les actions du TGF- β 1 sont nombreuses et complexes dans tous les types cellulaires, mais la signalisation intracellulaire implique les mêmes cascades. Le récepteur du TGF- β 1 comporte 2 chaînes, le TGF- β -RII qui permet la liaison du TGF- β 1, et le TGF- β -RI qui est recruté secondairement et permet la transduction du signal. Après liaison à son récepteur, le TGF- β 1 peut activer deux voies : la voie des Smads et la voie des MAPKs.

1.4.2.1 La voie des Smads

Les protéines Smads sont des homologues de deux protéines de la drosophile : «mothers against decapentaplegic » (MAD) et la protéine «*C. elegans*» SMA. Le nom Smad est la combinaison de ces deux noms (Massague *et al.*, 2005). L'activation de cette voie (Figure 8) implique premièrement la liaison du TGF- β 1 mature à son récepteur de type 2 (TGF- β RII) à la surface cellulaire. Cette liaison est suivie du recrutement du TGF- β RI pour former un hétérodimère correspondant au récepteur actif. L'activation du récepteur permet la phosphorylation directe des Smad-récepteurs (R-Smad) par le TGF- β RI sur le motif Ser-Ser-X-Ser de la partie C-terminale. Ces phosphorylations sont facilitées par la protéine SARA («Smad anchor for receptor activation») et HRS/HGS («hepatocytes growth factor-regulated tyrosine kinase substrate»). Ces protéines aident au recrutement et à la phosphorylation des Smads 2 et 3 au récepteur actif. Une fois les Smads 2-3 phosphorylées, celles-ci se

dissocient du récepteur et recrutent la «common-mediator Smad 4» (co-Smad4) pour former un complexe oligomérique. Après translocation au noyau, ce complexe se lie au SBE de l'ADN : GTCT (Smad binding elements : séquences riches en GC dans certains promoteurs). D'autre part, les I-Smad (inhibitory Smads) peuvent réguler négativement la signalisation du TGF- β 1. Dans le cas du TGF- β 1, les I-Smads entrent en compétition avec les Smad2-3 au niveau du TGF- β RI (Rahimi & Leof, 2007).

1.4.2.2 La voie des MAPK

La voie des Smads est la principale cascade de signalisation impliquée lors de l'activation des récepteurs du TGF- β 1. Mais le TGF- β 1 peut également induire l'activation des MAPK telles que ERK, p38 et JNK. L'activation des MAPKs (Figure 8) peut être lente ou rapide (entre 5 et 15 minutes) impliquant une activation via la voie des SMADs ou par une activation directe des MAPKKK. Par contre, les mécanismes d'activation des MAPK par les TGF- β R ne sont pas totalement compris. Certaines évidences montrent que ERK pourrait être activée via Ras et que JNK et p38 pourraient être activées par différentes MAPKKK comme TAK1 (TGF- β -activated kinase 1) et MKK3. De plus, la protéine Daxx pourrait servir de protéine adaptatrice permettant de lier les TGF- β R à la machinerie apoptotique et à la voie de JNK. Comme pour les actions du TGF- β 1, l'activation des MAPK dépend du type cellulaire impliqué (Javelaud & Mauviel, 2005).

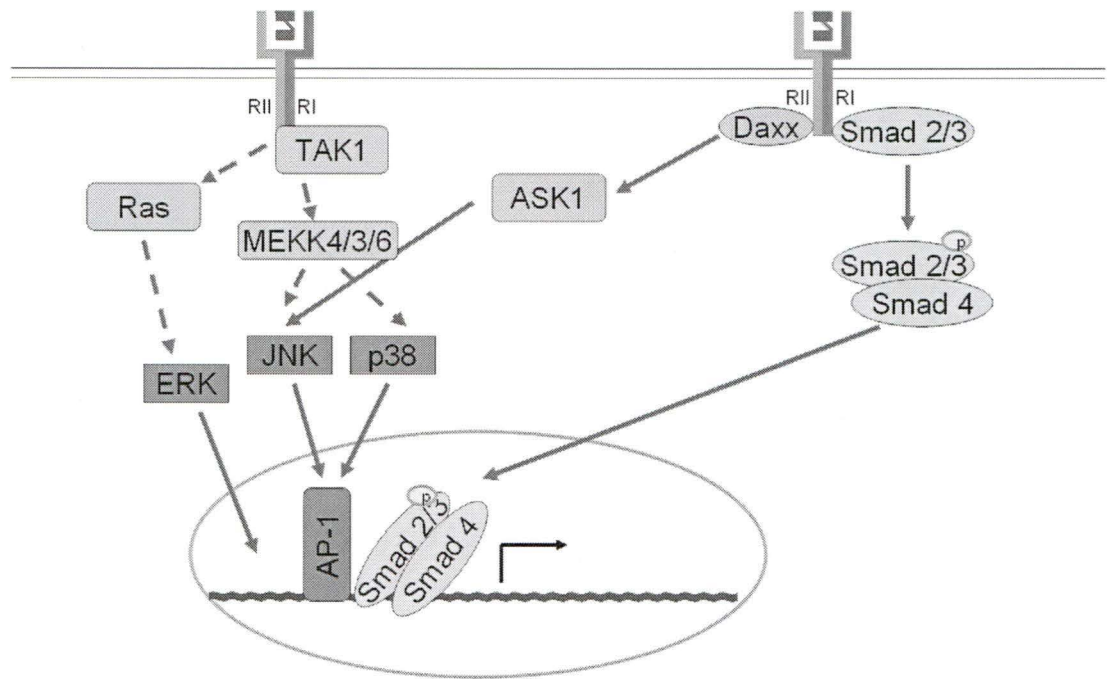


Figure 8 : Signalisation de la voie des Smads et de la voie des MAPK

La liaison du TGF-β1 à son récepteur mène à la formation d'un complexe comprenant les Smads 2-3 et 4 qui peut être transloqué au noyau pour induire l'expression des gènes cibles. L'activation des MAPKs implique plusieurs protéines comme Daxx, ASK1, TAK1, Ras et les MEKK 4/3/6 pouvant mener à l'activation de ERK, JNK et p38. Figure adaptée de (Javelaud & Mauviel, 2005)

1.4.3 L'induction de l'apoptose par le TGF- β 1

Le TGF- β 1 est impliqué dans la prolifération et la différenciation cellulaire, mais aussi dans l'apoptose dans différentes situations. Ces différentes fonctions varient selon les cellules étudiées, la concentration utilisée ou le temps d'exposition. Pour induire l'apoptose, le TGF- β 1 n'utilise pas un mécanisme spécifique et unique, mais différentes voies selon les conditions. Le TGF- β 1 peut ainsi activer l'apoptose via l'activation de la voie des Smads ou celle des MAPKs.

1.4.3.1 L'induction de l'apoptose par la voie des Smads

L'activation de la voie des Smads mène à la formation d'un complexe protéique agissant comme un facteur de transcription pouvant moduler l'expression de gènes cibles dont plusieurs sont impliqués dans l'apoptose de la cellule. Premièrement, le TGF- β 1 peut moduler l'expression des homologues Bcl-2 qui sont directement liés à l'apoptose. Il a été montré que le TGF- β 1 pouvait induire l'expression de Bim (Ohgushi *et al.*, 2005, Ramjaun *et al.*, 2007, Wildey *et al.*, 2003) et de Bmf (Ohgushi *et al.*, 2005, Wildey *et al.*, 2003). L'expression de Bax peut être augmentée par le TGF- β 1 (Teramoto *et al.*, 1998). D'un autre côté, la voie des Smads permet la répression des homologues anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL (Wildey *et al.*, 2003) (Francis *et al.*, 2000). La voie des Smads peut aussi modifier l'activité de certains homologues pro-apoptotiques. En effet, le TGF- β 1 peut induire le clivage et l'activation de Bad de façon Smad dépendante (Kim *et al.*, 2002). Une

augmentation de l'expression des homologues pro-apoptotiques combinée à une diminution de celle des protéines anti-apoptotiques mène à la perte de l'intégrité de la mitochondrie donc à la libération du cytochrome *c* dans le cytosol, et à l'activation de la voie apoptotique intrinsèque.

L'activation de la voie des Smads permet l'augmentation de l'expression de deux protéines impliquées dans l'apoptose : GADD45B «Growth arrest and DNA-damage» et DAP-kinase «Death-associated protein kinase». Le gène de GADD45B est induit par p53 et GADD45B pourrait être impliqué dans la vérification G₂/M lors de la réplication de l'ADN. Il pourrait induire l'apoptose par l'activation de p38 et/ou JNK (Sheikh *et al.*, 2000). La DAPkinase est une kinase sérine/thréonine régulée par le Ca²⁺/calmoduline (CaM) qui peut moduler l'apoptose. L'activation de DAPkinase se fait lors d'une élévation du calcium intracellulaire souvent observée lors de l'induction de l'apoptose et par la déphosphorylation de la sérine 308. Les effets les mieux connus de DAPkinase sont sur le cytosquelette. La DAPkinase est impliquée dans la formation des corps apoptotiques et la perte de l'attachement à la matrice extracellulaire. Ces actions peuvent être expliquées par les capacités de DAPkinase à phosphoryler la chaîne légère de la myosine II pour son activation menant à un changement au niveau du cytosquelette(Bialik & Kimchi, 2006). Le complexe des Smads ne semble pas avoir des effets sur l'expression des protéines inhibitrices d'apoptose (IAP) mais il a été rapporté que les XIAP pouvaient diminuer l'induction de l'apoptose en se liant aux membres des cascades induites par le TGF-β1 (Birkey Reffey *et al.*, 2001).

Les Smads inhibiteurs, comme Smad7, peuvent avoir un rôle dans l'apoptose. De façon générale, les Smads inhibiteurs diminuent l'induction de l'apoptose par le TGF- β 1 en inhibant l'interaction des Smad2/3 avec les récepteurs (Halder *et al.*, 2005), mais dans des systèmes de surexpression, Smad7 permet l'induction de l'apoptose par une activation de p38 et de JNK (Edlund *et al.*, 2003, Mazars *et al.*, 2001). Smad7 servirait dans ce cas de protéine adaptatrice favorisant l'interaction entre le récepteur du TGF- β et MKK3.

1.4.3.2 L'induction de l'apoptose par la voie de p38

Le TGF- β 1 pourrait activer trois voies différentes des MAPK : ERK, p38 et JNK. La voie de ERK1/2 est principalement impliquée dans la prolifération, la migration et la différenciation cellulaire. D'un autre côté, JNK et p38 exercent un effet positif ou négatif sur l'apoptose régulée par le stress. De façon générale, l'état de la cellule est le résultat de la balance d'activité de ces trois voies lors d'une stimulation par le TGF- β 1 (Sanchez-Capelo, 2005).

La MAPK p38 possède quatre isoformes (α , β , δ et γ) qui sont exprimées de façon différentielle selon les tissus (Olson & Hallahan, 2004). De plus, les kinases capables d'activer p38 (MKK6, MKK4 et MKK3) n'ont pas toutes les mêmes cibles. Par exemple, MKK3 active les isoformes alpha, delta et gamma et l'induction de l'apoptose par p38 pourrait dépendre de l'isoforme selon les types cellulaires (Davis,

2000). Le mécanisme utilisé par p38 pour mener à l'apoptose n'est pas encore connu, mais les monoamines oxydase et p53 pourraient être impliquées. D'autres observations ont été faites dans des cellules lymphomateuses de type B objectivant une activation de la caspase 8 et de Bid via p38 en présence de TGF- β 1. D'un autre côté, TGF- β 1 permet une activation rapide ou lente de p38 selon le type cellulaire. L'activation rapide serait médiée via TAK1 alors que l'activation lente serait médiée par l'augmentation d'expression et d'activité de GADD45B. En résumé, l'induction de l'apoptose via p38 est variable et dépendante en particulier du type cellulaire.

1.4.3.3 L'induction de l'apoptose par la voie de JNK

L'activation de JNK nécessite, comme dans le cas de p38, l'interaction de protéines adaptatrices. La protéine Daxx interagit avec le récepteur de type II du TGF- β et, à l'aide de ASK1, permet l'activation de JNK. De plus, TAK1 permet l'activation de JNK (Sanchez-Capelo, 2005). Les mécanismes utilisés par JNK pour l'induction de l'apoptose ne sont pas entièrement connus. Certaines observations semblent montrer que la coopération entre les facteurs de transcription des Smads et de AP-1 (dimère JunD-FosB) permet de restreindre l'expression de gènes spécifiques de l'apoptose. JNK pourrait avoir des actions autres que l'induction d'expression de gènes. Par exemple, la translocation rapide de JNK2 à la mitochondrie pourrait induire la libération du Cyt c. JNK pourrait aussi phosphoryler Bim permettant l'activation de l'apoptose via Bax et la libération de Cyt c (Sanchez-Capelo, 2005).

1.4.4 Les actions du TGF- β 1 dans les cellules osseuses

1.4.4.1 Les actions du TGF- β 1 sur les ostéoblastes

De façon générale, le TGF- β 1 augmente la formation osseuse *in vitro et in vivo*. Il favorise le recrutement des cellules progénitrices ostéoblastiques et stimule leur différenciation initiale et leur prolifération. Il ne peut toutefois induire une différenciation complète en ostéoblaste mature. De plus, TGF- β 1 inhibe l'apoptose des ostéoblastes. Dans l'étape tardive de la différenciation, l'action du TGF- β 1 s'oppose à celle de BMP2 qui est le principal facteur induisant la différenciation des ostéoblastes. Les différences entre les fonctions positives ou négatives du TGF- β 1 seraient dues au changement du niveau d'expression de ses récepteurs dans les différentes phases de différenciation. En effet, une diminution de l'expression du TGF-RI et TGF-RII est observée au cours du processus de différenciation (Janssens et al., 2005). Par ailleurs, le TGF- β 1 inhibe l'expression de Runx2 via la voie Smad3, Runx2 étant le principal facteur de transcription impliqué dans la formation osseuse (Alliston *et al.*, 2001). Ces différents résultats reflètent un rôle plus régulateur de la formation osseuse attribué au TGF- β 1.

1.4.4.2 Les actions du TGF- β 1 sur les ostéoclastes

Encore une fois, les actions du TGF- β 1 sur les ostéoclastes sont divergentes. Les résultats obtenus varient selon le type de culture, la concentration utilisée et le temps d'exposition au TGF- β 1.

Les effets du TGF- β 1 dans un système de coculture, système dans lequel les ostéoblastes sont présents pour permettre la différenciation des ostéoclastes, le TGF- β 1 semble être un inhibiteur de la formation ostéoclastique. En effet, le TGF- β 1 permet l'augmentation d'expression de l'OPG et une diminution de l'expression du RANKL et cela, à forte concentration c'est-à-dire à des concentrations comprises entre 0,1 à 10 ng/ml (Takai *et al.*, 1998). À des concentrations plus faibles (1-100 pg/ml), une augmentation de la formation ostéoclastique est observée (Kale & Vaidya, 2004). Ces effets contradictoires pourraient s'expliquer par une activation de ERK à faible concentration et de p38 à forte concentration (Kale, 2004).

Le TGF- β 1 peut aussi avoir des actions directes sur l'ostéoclaste. De nombreux travaux ont montré que le TGF- β 1 stimulait directement la formation ostéoclastique chez la souris et chez l'humain. En effet, à des concentrations de 0,1 ng/ml et plus en TGF- β 1, une augmentation de l'expression de RANK, du CTR ainsi que de l'intégrine $\alpha\beta_3$ est observée en présence de TGF- β 1 ajouté dans les premiers jours de la différenciation (Orcel *et al.*, 1990); (Fuller *et al.*, 2000). L'induction de l'ostéoclastogénèse serait principalement due à l'activation du facteur de

transcription NF- κ B dans les précurseurs ostéoclastiques, stimulée par le TGF- β 1 chez la souris à de fortes concentrations (KANEDA *ET AL.*, 2000). De plus, l'expression du facteur de transcription NFATc1 est aussi directement stimulée par le TGF- β 1 encore une fois chez la souris à de fortes concentrations (Fox *et al.*, 2008). Cette augmentation de NFATc1 pourrait résulter de l'activation de la MAPK p38 par le TGF- β 1 (Karsdal *et al.*, 2003);(Huang *et al.*, 2006).

Les effets du TGF- β 1 sont en fait complexes : si le TGF- β 1 stimule l'expression de certains marqueurs du phénotype ostéoclastique comme RANK, le VNR ou le CTR, en revanche il diminue la prolifération des précurseurs ostéoclastiques mononucléés et leur fusion en cellules multinucléées (Orcel *et al.*, 1990).

Par ailleurs, plusieurs travaux ont montré chez la souris et chez l'homme que le TGF- β induisait l'apoptose des ostéoclastes matures (Hughes *et al.*, 1996) ;(Roux *et al.*, 2005). Toutefois les mécanismes conduisant à cette apoptose sont actuellement inconnus.

Il a été reporté quelques études *in vivo*, où les ostéoclastes sont présents dans un environnement comportant plusieurs types cellulaires capables de répondre au TGF- β , une production exagérée de TGF- β 2 dans un modèle de souris transgénique conduisait à une augmentation de la résorption osseuse et une diminution de la masse osseuse (Erlebacher & Derynck, 1996). En revanche dans un modèle murin où la

signalisation du TGF- β est inhibée, on observe une augmentation de la masse osseuse est observée (Dabovic *et al.*, 2005).

Globalement, c'est-à-dire *in vivo*, le TGF- β est considéré comme un inhibiteur de la formation ostéoclastique et de la résorption osseuse, possiblement du fait de la diminution du ratio RANKL:OPG qu'il entraîne.

Le TGF- β 1 semble avoir un rôle important sur le contrôle du remodelage osseux. Il stimule la formation ostéoclastique initiale mais bloque également la résorption osseuse en induisant l'apoptose des ostéoclastes, et en diminuant le ratio RANKL:OPG dans le microenvironnement osseux. Par ailleurs le TGF- β 1 apparaît comme un régulateur de la formation osseuse, il stimule la différenciation ostéoblastique et inhibe l'apoptose des ostéoblastes, mais il exerce également un effet inhibiteur sur l'expression des PAL et la minéralisation via une inhibition de Runx2.

Ces données font du TGF- β 1 un facteur régulateur du remodelage osseux. Le TGF- β 1 pourrait en particulier être impliqué dans le couplage entre résorption osseuse et formation osseuse

Le travail présenté dans ce mémoire traite dans une première partie, de l'effet de l'ostéoprotégérine sur la survie des ostéoclastes, en présentant les principaux résultats et l'article tirés de ces travaux. La deuxième partie évalue les effets du TGF- β sur les ostéoclastes, en particulier son rôle dans l'apoptose et les mécanismes

impliqués dans cet effet pro-apoptotique. Dans l'ensemble du travail nous avons utilisé un modèle de différenciation ostéoclastique *in vitro* à partir de monocytes foetaux provenant de sang de cordon ombilical nous permettant d'évaluer l'effet de ces facteurs sur des ostéoclastes humains matures.

2 MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 Réactifs utilisés

Les cytokines, les facteurs de croissance, TRAIL humain recombinant (rhTRAIL), rh M-CSF, rhGM-CSF, de même que l'OPG et la Staurosporine proviennent de R&D Systems, de même que l'anticorps anti-hTRAIL, le rhTGF- β provient de Peprotech. Les anticorps anti-caspases (-3, -8, -9), les anticorps anti-actine, et les anticorps dirigés contre les parties phosphorylées ou non phosphorylées des Smad, ERK, p38 et JNK, les anticorps HRPanti-lapin proviennent de Cell Signaling. À l'exception des anti-caspases-8 qui sont des monoclonaux de souris, tous les anticorps de Cell Signaling sont des anticorps monoclonaux de lapin. Les anticorps polyclonaux de chèvre dirigés contre les récepteurs du TGF- β (RI et RII) et les anticorps polyclonaux de lapin anti-homologues Bcl-2 proviennent de Santa Cruz. L'anticorps HRP anti-souris et le Ficoll-Paque proviennent de Amersham Biosciences, le DMEM et les antibiotiques sont de chez Wisent et finalement, l'OPTI-MEM de chez Gibco.

2.2 Cultures de monocytes de sang de cordon ombilical

Le sang de cordon ombilical humain est prélevé stérilement immédiatement après la délivrance, après consentement éclairé de la femme, et recueilli dans des

tubes héparines. Une quantité de 50 ml environ par sang est en moyenne obtenue. Après dilution volume à volume dans du DMEM, les leucocytes mononucléés sont séparés par centrifugation sur un gradient de densité (Ficoll-Paque), la suspension cellulaire de faible densité à l'interphase sérum/Ficoll contient les cellules mononucléées (cellules monocytaires et lymphocytes). Cette fraction cellulaire est prélevée, lavée par centrifugation dans du D-MEM, le culot cellulaire est resuspendu et le nombre de cellules obtenues est compté à l'aide d'une cellule de Malassez, après ajout de 8% v/v d'une solution de 80 g de NH_4Cl dans du PBS 1X afin de détruire les globules rouges. La viabilité des cellules est évaluée par exclusion du bleu de trypan; les cellules sont de nouveau lavées par centrifugation, et le culot cellulaire resuspendu dans le milieu de culture composé de milieu OPTI-MEM, contenant 2% de sérum de bovin foetal (FBS; Gibco), des antibiotiques (1% pénicilline/streptomycine et 0,2% d'amphotéricine B), de la glutamine 2 mM. Le volume dans lequel est repris le culot permet d'obtenir une suspension cellulaire contenant 3×10^6 cellules /ml qui est placée dans des chambres de culture en plastique, Lab-Tek®, 0,4 ml par puits. Après une nuit d'incubation à 37°C en atmosphère humidifiée air- 5% CO_2 , les cultures sont lavées afin d'éliminer les cellules non adhérentes, puis les cellules sont mises en culture dans le même milieu et du GM-CSF 100 pg/ml est ajouté pour 3 jours. Par la suite, le milieu est changé deux fois par semaine avec du OPTI-MEM 2% FBS plus antibiotiques en présence de M-CSF 25 ng/ml et RANKL (produit au laboratoire) 100 ng/ml. Après 21 jours de culture, des ostéoclastes matures pleinement différenciés sont obtenus. Les conditions d'étude de l'apoptose comportent une déprivation en facteurs de

différenciation M-CSF et RANKL, et le taux de sérum est diminué à 1 % FBS pour une période de 24 heures.

2.3 Expression et purification de RANKL

Le vecteur d'expression pGEX a été transformé dans des bactéries *E.coli* BL21 compétentes. Afin d'obtenir une quantité élevée de bactéries capables de produire le RANKL, une colonie est inoculée dans des tubes contenant 50 mL de milieu LB avec 50 µg/mL d'ampicilline et incubée sous agitation à 37°C jusqu'au lendemain. Ces cultures sont alors ajoutées à 500 mL de nouveau milieu LB supplémenté d'ampicilline et incubés à 37°C sous agitation jusqu'à l'obtention d'une densité optique (DO) se situant entre 0,6 et 0,8 à une longueur d'onde de 595 nm. Par la suite, l'ajout de 2 mM d'IPTG aux bactéries permet l'induction de l'expression des protéines. Ces cultures sont incubées avec agitation à 22°C jusqu'au lendemain. Par la suite, les bactéries sont récoltées par centrifugation à 3000 rpm pour 25 minutes à 4 °C. Le culot est resuspendu dans du tampon de lyse à 4°C (PBS 1X, pH 7.4, 1% Triton X-100, 1/1000 CLAP, 1/1000 PMSF). La lyse bactérienne est poursuivie par 6 cycles de sonications sur glace de 30 secondes à 35 % d'intensité. Le lysat est ensuite centrifugé à 13000 rpm pour 15 min à 4°C. Le surnageant est recueilli et est ajouté aux billes de glutathione-sépharose (GE Healthcare) préalablement lavées avec du PBS 1X froid. Ce mélange est agité par rotation à 4 °C pendant 30 minutes et est suivi d'une centrifugation à 1500 rpm pour 5 minutes à 4 °C. Le surnageant est éliminé et les billes sont ensuite lavées à 8 reprises avec du PBS 1X froid. Les

lavages se font de la même façon, c'est-à-dire avec l'ajout de 8 ml de PBS 1X froid aux billes suivi de 5 minutes d'agitation et terminés par une autre centrifugation pour éliminer le surnageant. Les billes sont transférées dans un tube eppendorf, 250 µL de tampon d'élution sont ajouté (20mM glutathion dans 50mM Tris-HCl pH 8.0), et sont incubées avec agitation à température ambiante pour 20 minutes. Le tube est centrifugé à 5000 rpm pendant 5 minutes et le surnageant est recueilli dans un autre tube. L'élution est répétée à 4 autres reprises. Toutes les fractions éluées sont analysées par SDS-PAGE et la concentration de protéines est déterminée à l'aide du kit «RC DC protein assay» (Bio-Rad). Les éluats sont combinés et entreposés en aliquots de 100µl à -80 °C. L'efficacité biologique de la protéine est vérifiée par des essais de différenciation sur plastique et sur lamelles osseuses.

2.4 Évaluation de l'apoptose par technique du TUNEL

Pour détecter et quantifier l'apoptose des ostéoclastes, nous avons utilisé le kit TACS Blue Label de R&D Systems. Cette technique dérivée du TUNEL permet de visualiser la dégradation internucléosomale de l'ADN à l'échel cellulaire par cytochimie.

Les cellules sont cultivées comme mentionné (§ 2.2), placées à 3×10^6 cellules /ml dans des chambres de culture sur lame de verre, Lab-Tek®, 0,4 ml par puits. A la fin des cultures, les cellules sont fixées pendant 10 minutes à -20°C avec une solution glaciale de 2 volumes d'éthanol et de 1 volume d'acide acétique (2 : 1). La fixation est suivie par 8 lavages de 15 minutes au PBS 1X pour bien réhydrater les cellules.

La fixation avec cette solution perméabilise les membranes. Le contrôle positif (2 μ L de Nucléase diluée dans 100 μ L de «Nucléase buffer») est incubé dans le puits correspondant pendant 20 minutes à 37 °C. Les autres puits sont remplis de PBS 1X pendant ce temps. Par la suite, la lame est démontée et elle est trempée pendant 5 minutes à température ambiante dans une solution de peroxydase (5 ml de H₂O₂ dans 45 ml de Méthanol). La lame est ensuite plongée dans du PBS 1X à 3 reprises pendant 5 minutes, puis plongée 5 minutes dans le tampon «TdT Labelling» (5 ml de «TdT Labelling Buffer 10X» dans 45 ml d'eau nanopure). La lame est ensuite placée dans une chambre humide et 20 μ l du mélange de réaction sont ajoutés sur la lame pour une durée de 2 heures à 37 °C. Le mélange de réaction est fait de 3,6 μ L de TdT-dNTP, 3,6 μ L de Manganèse, 3,6 μ l d'enzyme TdT dans un volume de 180 μ l du tampon de «TdT Labelling». Après 2 heures d'incubation, la lame est placée pendant 5 minutes à température ambiante dans le tampon «STOP TdT» (5 ml de «STOP TdT buffer 10X» dans 45 ml d'eau nanopure). La lame est plongée dans l'eau nanopure à 3 reprises et les côtés sont séchés pour y ajouter la solution de Streptavidin-HRP (1 μ L de «Streptavidin-HRP» dans 375 μ L de «Blue-Streptavidin-HRP diluent»). Une incubation à température ambiante de 30 minutes s'en suit et la lame est plongée dans l'eau nanopure à 3 reprises. Les côtés sont séchés et le marquage bleu des noyaux se fait avec la solution de «TdT Blue-label» pour 5 minutes. Le marquage se fait suite à une réaction enzymatique qui produit un précipité insoluble de couleur bleue. La lame est encore une fois lavée à l'eau et un contre-marquage est effectué avec la solution «nuclear FAST-red» pendant 30 minutes pour donner une coloration rose aux noyaux non-apoptotiques. Pour bien

enlever les traces d'eau, la lame est trempée dans une série de 4 solutions d'éthanol à concentration croissante (70%, 95% et 100%), puis dans une solution de xylène. La lame est montée dans un milieu hydrophobe et le marquage est regardé dans le visible au microscope, la quantification de l'apoptose est réalisée par comptage manuel. Les cellules ayant plus que 3 noyaux sont considérées comme des ostéoclastes. Les ostéoclastes ayant les noyaux bleus sont considérés apoptotiques ce qui permet d'obtenir un pourcentage de cellules multinucléées apoptotiques par rapport au nombre total de cellules multinucléées.

2.5 Immunobuvardage de type Western

L'analyse par Western permet d'étudier l'expression de différentes protéines à partir d'une extraction protéique des cultures. À la fin des cultures, les cellules sont lavées à deux reprises avec du PBS 1X froid le contenu cellulaire est recueilli à l'aide d'un tampon de lyse (150 mM NaCl, 50 mM de Tris, 1% de NP40, 0,5% désoxycholate, 10 mM de pyrophosphate de sodium, 0,1% SDS, 5 mM d'EDTA). La lyse se fait sur glace pendant 20 minutes aidée par grattage des puits avec un policeman. Le contenu de la lyse cellulaire est centrifugé pendant 15 minutes à 13000 rpm à 4C pour retirer les débris. Une quantité de 50 µg de protéines est séparée sur gel SDS-PAGE 12 % et les protéines sont transférées sur une membrane de PVDF à l'aide d'un appareil de transfert semi-sec (Bio-Rad).

Une fois le transfert effectué, la membrane est bloquée pendant 2 heures dans une solution de TBS-Tween (2,42 g/L Tris base, 8 g/L NaCl, 0,1% Tween 20 à pH

7,5) contenant 5% de lait écrémé (ou BSA 5% utilisé pour l'immunobuvardage utilisant l'anticorps contre la phospho-JNK). Par la suite, l'anticorps primaire dirigé contre la protéine d'intérêt est ajouté dans la solution de blocage. Les concentrations d'anticorps utilisées et les fournisseurs sont fournis dans le tableau 1. L'anticorps primaire est incubé à 4 °C avec agitation pendant une nuit complète. Le lendemain, la membrane est lavée à 3 reprises pendant 15 minutes à température ambiante avec agitation avec du TBS-Tween. L'anticorps secondaire est ajouté par la suite dans la solution de blocage aux concentrations indiquées dans le tableau 1. Une incubation de 3 heures s'en suit à température ambiante avec agitation. La membrane est ensuite lavée au TBS-Tween à 3 reprises pendant 15 minutes. La liaison des anticorps est visualisée par un système de détection par chimiluminescence (ECL, Amersham Bioscience). La détection de la chimiluminescence est effectuée en partie sur film (Kodak) et l'autre partie sur le Versadoc (Biorad). L'intensité des bandes est mesurée avec le logiciel Quantify One venant avec l'appareil Versadoc (Biorad).

Pour la réutilisation d'une membrane pour l'exposer à un anticorps différent, la membrane après révélation est décapée à l'aide d'une solution contenant 7,56 g/L de Tris base, 20 g/L de SDS, 7 ml/L de β -mercaptoéthanol et la solution est à un pH de 6,7. Le décapage est d'une durée de 30 minutes à 55 °C. Par la suite, la membrane est lavée à 6 reprises dans le TBS-Tween pendant 15 minutes. Un nouveau immunobuvardage de type Western peut être recommencé à partir de l'étape de blocage avec la solution de TBS-Tween avec 5% de lait écrémé. L'utilisation de l'appareil à transfert semi-sec et une bonne quantité de protéines (50 μ g) permettent d'effectuer 8 décapages.

Anticorps	Dilutions utilisées
Anti-caspase 8	1/250
Anti-caspase 9	1/500
Anti-caspase 8 clivée	1/100
Anti-caspase 9 clivée	1/100
Anti-TGF-BRI	1/100
Anti-TGF-BRII	1/100
Anti-pJNK	1/250
Anti-JNK	1/1000
Anti-pERK	1/1000
Anti-ERK	1/1000
Anti-pp38	1/500
Anti-p38	1/1000
Anti-pSmad2	1/1000
Anti-Smad2	1/1000
Anti-Actine	1/1000
Anti-Bcl-2	1/250
Anti-Bid	1/250
Anti-Bax	1/250
Anti-Bim	1/250
Anti-rabbit-HRP	1/2000
Anti-mouse-HRP	1/500

Tableau 1 : Anticorps utilisés en Western et en Immunocytochimie et dilutions utilisées

2.6 Immunocytochimie

À la fin des cultures, les cellules sont lavées au PBS 1X à deux reprises et elles sont fixées dans du PFA 3,7% pendant 10 minutes à la température ambiante. Par la suite, les cellules sont rincées au PBS 1X à 3 reprises. Les cellules sont perméabilisées avec une solution de PBS 1X contenant 1% de Triton-X-100 pendant 10 minutes, sauf pour l'étude des récepteurs membranaires (TGF- β RI et RII). La perméabilisation est suivie de 3 lavages au PBS 1X et d'une incubation de 5 minutes avec une solution de peroxydase (kit LSAB2, DAKO). La lame est ensuite lavée à 3 reprises au PBS 1X et une solution de 5% lait écrémé dans le PBS 1X est ajoutée et laissée en place pendant 1 heure dans le but de bloquer les sites de liaison non spécifiques. Ensuite, la solution de blocage contenant l'anticorps primaire est ajoutée aux cellules, l'incubation se fait à 4°C pour la nuit. Les concentrations utilisées sont indiquées dans le tableau 1. Les cellules sont alors lavées à trois reprises avec du PBS 1X. Par la suite, l'anticorps secondaire biotinylé (kit LSAB2, DAKO) est ajouté pendant 45 minutes. Après trois lavages au PBS 1X, la lame est recouverte de la solution de «peroxidase-labelled streptavidin» (kit LSAB2, DAKO). Suite à trois lavages au PBS 1X, la révélation du marquage se fait avec le chromogène AEC (DAKO) et les lames peuvent être montées pour être observées au microscope.

2.7 Immunofluorescence

Comme pour les immunocytochimies, les cellules sont rincées au PBS 1X à 2 reprises et fixées dans du PFA 3,7% pendant 10 minutes. Après lavages dans du PBS 1X, la perméabilisation des cellules est effectuée avec une solution de PBS 1X contenant 1% de Triton-X-100 pendant 10 minutes. Suite aux 3 lavages au PBS 1X, les cellules sont incubées pour la nuit à 4°C dans une solution de PBS 1X contenant 0,1 M de glycine afin d'enlever l'autofluorescence de la PFA. Le lendemain, les cellules sont lavées au PBS 1X à 3 reprises et les sites de liaison non-spécifique sont bloqués pendant 45 minutes avec une solution de PBS 1X contenant 5% lait écrémé. L'anticorps primaire dilué dans la solution de blocage est ajouté par la suite sur les cellules et ceci est suivi d'une incubation pour la nuit à 4°C. Le lendemain, la lame est lavée à 3 reprises au PBS 1X et l'anticorps secondaire est déposé sur les cellules pour une durée de 1 heure. L'anticorps secondaire est couplé à un Alexa Fluor 546 qui émet dans le spectre rouge et il est dilué dans la solution de blocage (5% lait écrémé dans PBS). Les manipulations impliquant l'anticorps secondaire fluorescent sont toutes faites à l'abri de la lumière et les lames sont cachées de la lumière en tout temps après l'incubation de l'anticorps secondaire. Par la suite, la lame est lavée au PBS 1X et les cellules sont exposées au DAPI pendant 15 secondes pour visualiser les noyaux suite à une excitation aux UV. La lame est montée avec une solution contenant 1 volume de PBS 1X et 1 volume de glycérol et elle est visualisée au microscope à fluorescence (Nikon Éclipse TE2000-U). Les photographies observées dans la section des résultats représentent une superposition d'une photographie des

noyaux (bleu), une photographie du marquage avec l'anticorps (rouge) et une photographie en visible (arrière-plan) pour visualiser les contours des cellules.

2.8 ELISA de TRAIL

Les milieux de culture dans lesquels un dosage de la concentration de TRAIL était envisagé ont été recueillis et placés à -80°C jusqu'à l'essai ELISA. La détermination de la concentration de TRAIL soluble et libre libéré dans le milieu de culture a été effectuée à l'aide d'un kit ELISA commercial (R&D Systems). La limite de détection de ce kit est une concentration de 2,8 pg/ml de TRAIL libre.

2.9 Extraction d'ARN, RT-PCR et PCR en temps réel

L'ARN total des cultures cellulaires est extrait à l'aide du kit RNeasy plus (Qiagen). Pour la RT-PCR, 1 µg d'ARN est utilisé pour effectuer la synthèse de l'ADNc. La transcription inverse est effectuée à 42°C pendant 1 heure dans 20 µL d'une solution de réaction contenant 2,5 mM de chaque dATP, dGTP, dCTP et dTTP (Amersham Biosciences), 20 U d'inhibiteur de RNase (RNAsin, Promega), 50 pmol d'amorce oligo-d(T)₁₅ (Promega) et 200 U de la transcriptase inverse de virus Moloney murins leucémiques (Promega). La PCR est effectuée avec 10 µl de l'ADNc en présence de 50 µl d'une solution de réaction contenant 2,5 U d'ADN *Taq* polymérase (Qiagen), 0,4 mM de chaque dNTP et 0,3 mM des deux amorces pour le TRAIL ou pour l'actine. Le tableau 2 montre les amorces utilisées. L'amplification

est faite pendant 30 cycles pour le TRAIL et 22 cycles pour l'actine. Les cycles avaient la séquence suivante : 95°C pendant 45 secondes, 55°C pendant 45 secondes, 72°C pendant 60 secondes et l'élongation finale était effectuée à 72°C pendant 7 minutes. 20 µl ont été transférés sur un gel de 1% d'agarose contenant 0,01% de bromure d'éthidium (Amersham Biosciences) et la migration de l'ADN était obtenue à un voltage de 80 V pendant 30 minutes. La visualisation a été faite à partir d'une excitation aux UV et les photographies ont été prises avec un appareil photo Kodak.

L'extraction d'ARN pour la PCR en temps réel (real time RT-PCR) a été effectuée selon la même méthode que celle utilisée pour la PCR. La synthèse de l'ADNc a été effectuée à l'aide du kit QuantiTect Primer Assay (Qiagen) et cet ADNc a été envoyé à la plateforme de RNomique de Génome Québec situé à l'Université de Sherbrooke pour une amplification quantitative de l'ADNc. Les amorces pour le TRAIL humain ont été générées, validées et la PCR en temps réel a été effectuée avec 200 nM d'amorces. De plus, 100 ng d'ADNc et 5 µl de "Power SYBR-green Master Mix" ont été ajoutés au mélange de réaction pour donner un volume total de 10 µl. L'amplification et la détection de TRAIL ainsi que de trois gènes références (PUM1, MRPL19 et RPL13A) ont été exécutées par le Realplex 2 Master Cycler (Eppendorf). La quantification et la normalisation des résultats ont été faites par ordinateur et tous les échantillons ont été utilisés en triplicata.

Amorces	Séquences
TRAIL Forward	5'-GGCTATGATGGAGGTCCAGGGGG-3'
TRAIL Reverse	5'-AGTTGGCTAACTGACCTGGAAAG-3'
Actine Forward	5'-AGCCATGCCAATCTCATCTTGT-3'
Actine Reverse	5'-ACGGCTGCTTCCAGCTCCTC-3'

Tableau 2 : Amorce pour les PCR de TRAIL et d'actine

2.10 Analyses statistiques

Le test statistique « Wilcoxon » a été employé pour déterminer la significativité des résultats. Ce test permet l'analyse de résultats paires dont la distribution n'est pas normale (e.g. distribution selon une courbe de Gauss). Nous considérons significatifs les résultats où $p < 0.05$. Tous les tests statistiques ont été calculés avec le logiciel GraphPad Prism version 5.

3 Ostéoprotégérine et Apoptose de l'ostéoclaste

L'ostéoprotégérine (OPG) étant un puissant inhibiteur de la résorption osseuse, de la formation et de l'activité des ostéoclastes, nous avons soulevé l'hypothèse que ce facteur pourrait avoir un effet sur l'apoptose de ces cellules. Les effets de l'OPG sur l'apoptose des ostéoclastes pourraient se situer à plusieurs niveaux. D'une part, ce membre de la famille des récepteurs du TNF peut influencer sur la survie de la cellule via l'inhibition de l'action du RANKL, facteur essentiel de la différenciation et de l'activité des ostéoclastes. Mais en plus, une interaction de l'OPG avec la voie TRAIL pourrait intervenir. En effet, TRAIL est une molécule pro-apoptotique, et est le 2^{ème} ligand de l'OPG. L'équipe du Dr Roux ont démontré que les ostéoclastes exprimaient les récepteurs TRAIL-R1 et TRAIL-R2 et que ces cellules étaient sensibles à l'apoptose induite par TRAIL (Roux et al., 2005).

3.1 L'ostéoprotégérine diminue l'apoptose des ostéoclastes humains

L'effet de l'OPG a été évalué dans des cultures d'ostéoclastes différenciés à partir de monocytes fœtaux. Après 24 heures de culture en milieu déprivé en facteurs de survie (M-CSF et RANKL), des concentrations croissantes d'OPG (1 à 100 ng/ml) ont été ajoutées, et l'apoptose évaluée par la technique du TACS-Blue après 24 heures (Figure 9). Une diminution dose-dépendante de l'apoptose des ostéoclastes humains était observée, $24,4 \pm 5,7\%$ des cellules multinucléées (CMNs) étaient

apoptotiques en présence de 100 ng/ml d'OPG contre $46,6 \pm 4,8\%$ des CMNs dans les contrôles ($p=0,003$). En présence de M-CSF (25 ng/ml) qui est un facteur de survie, $25,8 \pm 4,1 \%$ de cellules MNC apoptotiques étaient observées ($p<0,05$ vs contrôles).

3.2 L'ostéoclaste humain exprime TRAIL

Afin d'expliquer cette baisse surprenante du niveau d'apoptose en présence d'OPG, nous avons évoqué la possibilité d'une interaction avec la voie TRAIL et évalué l'effet d'un anticorps anti-TRAIL dans ces cultures.

Le niveau d'apoptose était significativement diminué avec $31,7 \pm 3,2 \%$ de CMN en apoptose en présence d'anti-TRAIL comparativement à $53,1 \pm 5,1 \%$ chez les contrôles ($p=0,03$)(Figure 9). Ceci montre que l'apoptose des ostéoclastes semble impliquer la voie de TRAIL et suggère la présence de TRAIL dans le milieu de culture.

Comme TRAIL n'était pas ajouté dans les cultures, la possibilité d'une production endogène de TRAIL était alors évoquée. Pour vérifier cette expression, des expériences d'immunocytochimie à l'aide d'un anticorps dirigé contre TRAIL ont été réalisées. À la figure 10-A, nous remarquons un fort marquage de TRAIL des cellules multinucléées, démontrant que ces cellules expriment TRAIL alors que les contrôles faits avec des concentrations identiques de sérum normal de chèvre (figure

10 B) ne possèdent aucun marquage. Un comptage (figure 10 C) des CMN positives pour l'expression de TRAIL démontre que $47,9 \pm 2,6$ % des CMN expriment ce facteur de mort dans des cultures réalisées en présence de M-CSF et de RANKL. Lorsque nous effectuons une déprivation, c'est-à-dire lors de la diminution de la concentration de FBS à 1 % et en absence de M-CSF et de RANKL dans le milieu, le pourcentage de CMN positives pour TRAIL augmente à $69,8 \pm 3,9$ % ($p < 0,01$). Suite à l'ajout de RANKL après une déprivation de 12 heures, la quantité de CMN positives diminue significativement à $53,3 \pm 5,0$ % ($p < 0,05$). Ces observations sont confirmées par RT-PCR (figure 10 D). En effet, le niveau d'expression d'ARNm est moins élevé dans les cellules cultivées en présence de RANKL (RL) comparativement aux cellules cultivées en son absence (NT). Ces résultats semblent indiquer que les ostéoclastes expriment TRAIL et que les niveaux d'expression augmentent en l'absence de facteurs de survie pour les ostéoclastes.

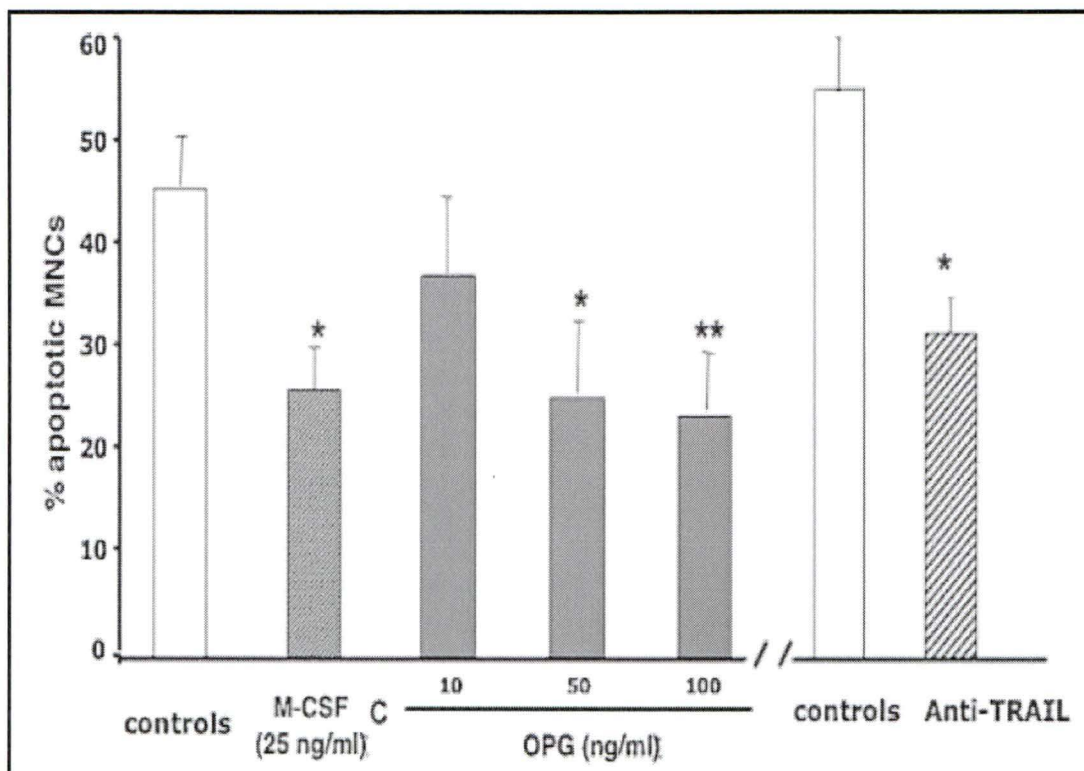


Figure 9 : Effets de l'OPG sur l'apoptose des ostéoclastes

À la fin de la culture, les cellules sont déprivées en facteurs de survie et l'OPG, le M-CSF et l'anti-TRAIL ont été ajoutés aux cellules et incubées pour une période de 24 h. L'apoptose a été évaluée par TUNEL et les résultats sont présentés en pourcentage de cellules multinucléées (MNC) en apoptose sur le nombre total de MNC. * : $p < 0,05$, ** : $p < 0,005$ (condition vs contrôles).

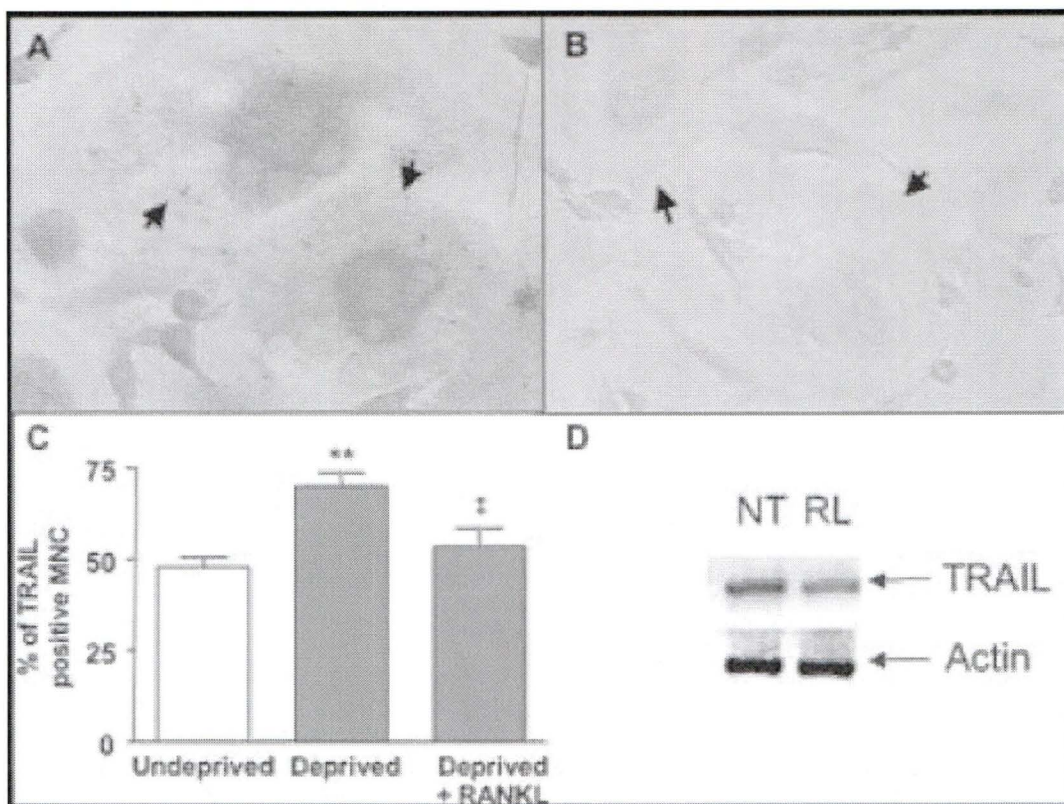


Figure 10 : Expression de TRAIL par les ostéoclastes

À la fin de la culture, l'expression de TRAIL a été évalué par immunocytochimie à l'aide d'un anticorps spécifique anti- TRAIL (A) ou avec un IgG de chèvre en tant que contrôle négatif (B). Les CMN ont été comptées dans les conditions non-déprivées, déprivées et déprivées avec l'ajout de RANKL. Les résultats sont présentés en pourcentage de MNC positives pour TRAIL par rapport au nombre totale de MNC (** : $p < 0,01$, ‡ : Deprived + RANKL vs Deprived $p < 0,05$) (C). L'expression de l'ARNm de TRAIL a été évalué par RT-PCR à l'aide d'amorces spécifiques pour TRAIL et l'actine (contrôle de la quantité d'ARNm). NT : cellules non-traitées (déprivées). RL : Cellules déprivées et traitées avec RANKL 100 ng/ml (D)

Pour induire l'apoptose, le TRAIL doit lier son récepteur présent à la membrane cytoplasmique de la cellule cible, ce qui implique que le TRAIL exprimé par les ostéoclastes doit être sécrété pour que celui-ci puisse induire l'apoptose des cellules environnantes. Pour vérifier la sécrétion du TRAIL dans le milieu, nous avons évalué les concentrations de TRAIL libre dans le milieu de culture par ELISA (Figure 11).

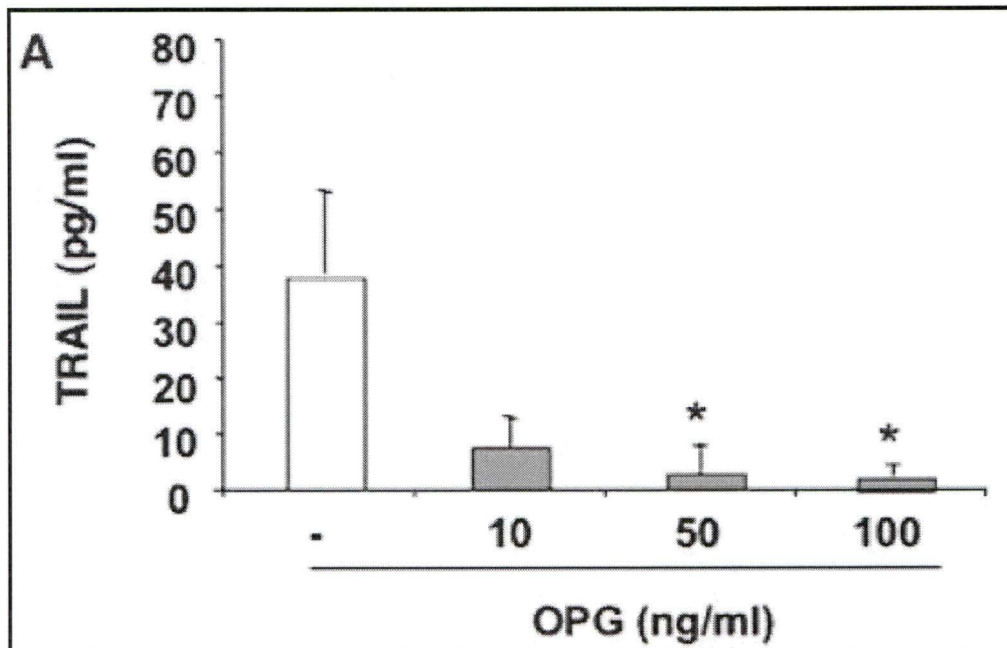


Figure 11 Concentration de TRAIL dans les milieux de culture des ostéoclastes

À la fin de la culture, les cellules ont été incubées dans un milieu avec FBS 1% et en absence de M-CSF et de RANKL pendant 24 heures. L'OPG a été ajoutée à différentes concentrations pour les 24 heures suivantes et la concentration de TRAIL a été évaluée par ELISA dans le milieu de culture (* : $p < 0,05$).

Dans les cultures réalisées en l'absence de facteur de survie (condition de déprivation), la concentration de TRAIL dans le milieu de culture était de $42,5 \pm 11,5$ % pg/ml. Ceci montre que TRAIL est sécrété par les ostéoclastes. Si nous ajoutons l'OPG dans le milieu de culture, les niveaux de TRAIL libre dans le milieu diminuent de façon concentration-dépendante. En effet, avec l'ajout de 100 ng/ml d'OPG, la concentration de TRAIL chute significativement à $0,3 \pm 2,1$ pg/ml ($p < 0,05$). La présence d'OPG dans le milieu de culture permettrait de diminuer la disponibilité du TRAIL à induire l'apoptose via leur liaison. L'OPG, en séquestrant le TRAIL dans le microenvironnement de l'ostéoclaste, permettrait d'expliquer la baisse des niveaux d'apoptose des ostéoclastes dans ces conditions de déprivation.

3.3 L'OPG diminue l'activation de la caspase 8 dans les ostéoclastes humains

TRAIL est un ligand de mort permettant l'activation de l'apoptose via la voie extrinsèque. Sachant que l'activation de la voie extrinsèque de l'apoptose implique l'activation de la caspase 8, nous avons évalué les niveaux d'activation de la caspase 8 dans les ostéoclastes en présence ou non d'OPG, afin de confirmer que l'OPG diminuait l'apoptose en limitant la disponibilité du TRAIL dans la culture. L'analyse de l'activation de la caspase 8 en immunobuvardage de type Western (Figure 12) dans les cultures de cellules déprivées en facteurs de survie, révèle la présence de la procaspase 8 (57 kDa) et un des fragments de la caspase 8 active (18 kDa). L'activation de la caspase 8 dans les cellules déprivées en M-CSF et RANKL et en

présence de 100 ng/ml d'OPG est moins importante que dans les cellules contrôles suggérant que l'activation de la voie extrinsèque est diminuée lorsque les cellules sont en présence d'OPG.

Comme les cultures d'ostéoclastes humains contiennent toujours un pourcentage résiduel de cellules mononucléées qui ne sont pas ostéoclastes, l'analyse de l'activation de la caspase 8 en Western pourrait comprendre l'activation de cette caspase 8 dans les monocytes non-différenciés. Pour s'assurer que l'activation de la caspase 8 observée est bien le fait des ostéoclastes, nous avons analysé l'activation de la caspase 8 dans les cultures par immunofluorescence. La visualisation de la caspase 8 active a été faite à l'aide d'un anticorps reconnaissant seulement la caspase 8 clivée (rouge) (figure 13). En 13-A, nous observons qu'il y a une activation de la caspase 8 dans les CMN déprivées en facteur de stimulation. Suite à l'ajout de 100 ng/ml d'OPG (13-B), l'intensité du marquage semblent diminuer dans les CMN comparativement aux cellules non-traitées suggérant que l'activation de la caspase 8 est diminuée dans ces conditions. En terme de contrôle, l'ajout de 10 ng/ml de TRAIL (13-C), qui est une concentration connue pour induire l'apoptose, augmente la proportion de cellules positives et l'intensité de l'expression de la caspase 8 activée, alors que l'ajout d'un anticorps anti-TRAIL (1/100) diminue la quantité de caspase 8 clivée dans les CMN. L'anticorps dirigé contre TRAIL agit dans ce cas en mimant l'action de l'OPG agissant ainsi à diminuer la disponibilité du TRAIL pour induire l'apoptose.

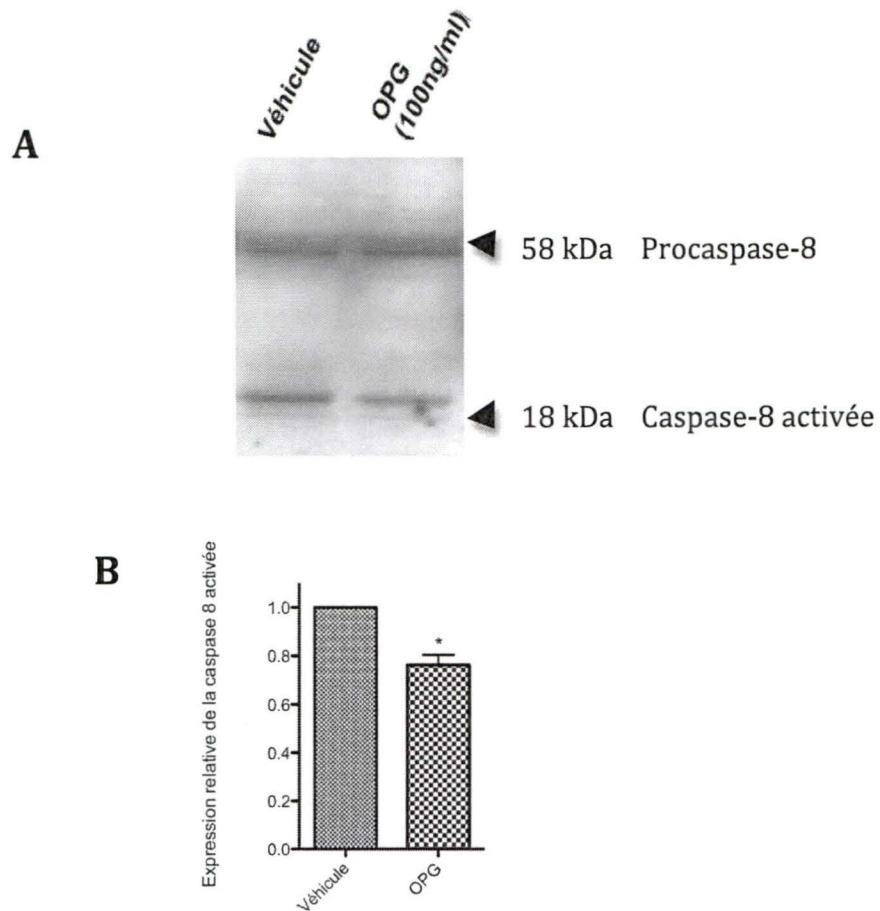


Figure 12: Activation de la caspase 8 par Western Blot

À la fin de la culture, les cellules ont été cultivées avec du FBS 1% en absence de M-CSF et de RANKL. L'OPG a été ajoutée 24 heures plus tard et les cellules sont incubées pour une période de 24 heures. L'immunobuvardage de type Western montre l'expression de procaspase 8 (57 kDa) et de la caspase 8 activée (18 kDa) (A). L'intensité moyenne d'expression de la caspase 8 active a été fait par densitométrie avec la bande clivée à 18 kDa (B).

Pour quantifier ces observations, nous avons effectué un comptage des cellules ayant plus de 3 noyaux et nous les avons classifiées selon l'intensité du marquage correspondant à l'activation de la caspase 8. Ces comptages permettent d'obtenir des pourcentages de CMN positives pour la caspase 8 activée (Figure 13 F). Dans les cellules ayant été cultivées en absence de M-CSF et de RANKL pendant 24 heures, $50,38 \pm 2,1\%$ des CMN expriment la caspase 8 activée. En présence de 100 ng/ml d'OPG, le pourcentage d'activation diminue à $37,8 \pm 2,7 \%$ ($p=0,003$). L'ajout de TRAIL à 10 ng/ml augmente significativement ce pourcentage à $64,0 \pm 3,2 \%$ ($p=0,03$) alors que l'ajout d'anti-TRAIL ramène le pourcentage à $40,25 \pm 6,7 \%$ ($p<0,05$) au même niveau que celui obtenu en présence d'OPG. Ces résultats d'immunofluorescence sur des cultures d'ostéoclastes confirment que le TRAIL sécrété par les ostéoclastes permet d'induire l'apoptose des ostéoclastes environnants via l'activation de la voie extrinsèque de l'apoptose.

L'ensemble des résultats de cette section suggèrent qu'en absence de facteur de survie, les ostéoclastes humains peuvent entrer en apoptose via la sécrétion de TRAIL dans l'environnement, et selon un processus autocrine, et que l'OPG, qui est un récepteur leurre pour le TRAIL, permet de diminuer l'apoptose des ostéoclastes humains en diminuant la disponibilité de ce TRAIL.

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication. (Chamoux *et al.*, 2008)

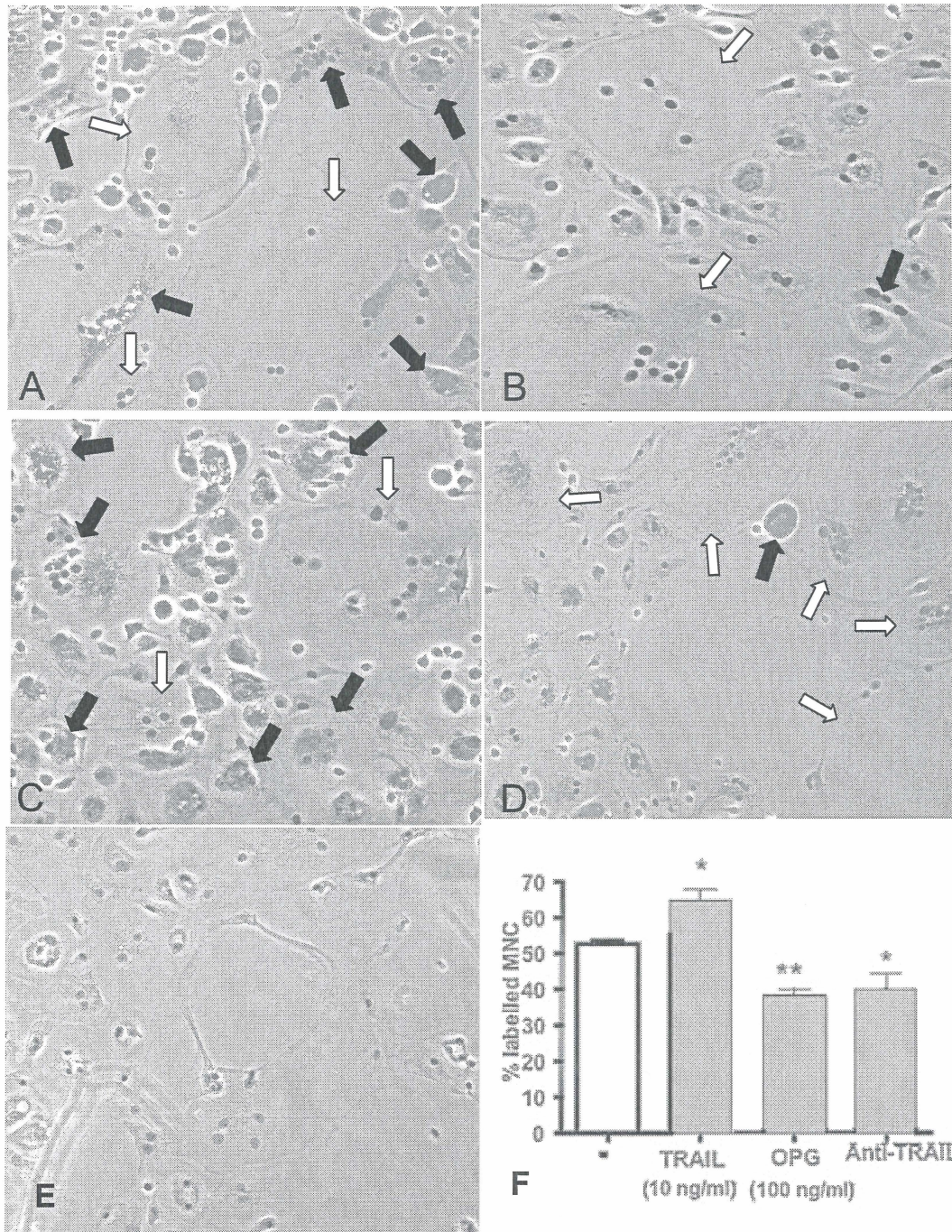


Figure 13 : Activation de la caspase 8 par immunofluorescence

À la fin de la culture, les cellules ont été déprivées (24 heures) (A) et traitées (24 heures) par OPG 100 ng/ml (B), rhTRAIL 10 ng/ml (C), anti-TRAIL (1/100) (D), IgG de souris (E). Les résultats sont exprimés en pourcentage de MNC positives c'est à dire exprimant la caspase 8 activée par rapport au nombre total de MNC (F). * : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$ (condition vs non-traitées (-))

4 Mécanismes impliqués dans l'apoptose des ostéoclastes humains induite par le TGF- β 1

Le TGF- β 1 est un important facteur du remodelage osseux et, comme mentionné dans l'introduction, ses actions sont variables selon les concentrations utilisées, les temps d'utilisation et les conditions de culture. L'équipe du Dr Roux ont démontré auparavant que le TGF- β 1 induisait l'apoptose des ostéoclastes humains lorsque ajouté en fin de culture (Roux et al., 2005). Tel qu'illustré sur la figure (14-C), ils ont démontré que le TGF- β 1 augmentait le pourcentage de CMN apoptotiques et ce, au même titre que certains facteurs connus pour induire l'apoptose comme le FASL (14-B) et le TRAIL (14-A). Contrairement au FASL et au TRAIL, les mécanismes utilisés par le TGF- β 1 pour induire l'apoptose des ostéoclastes humains ne sont pas connus. En effet, FASL et TRAIL activent la machinerie apoptotique par la voie extrinsèque c'est-à-dire en liant leurs récepteurs de mort à la surface de la cellule menant à l'activation de la caspase 8. D'un autre côté, le TGF- β 1 ne lie pas un récepteur de mort excluant la possibilité d'activation de la voie extrinsèque. Afin de déterminer les mécanismes d'induction d'apoptose par le TGF- β 1, nous avons tout d'abord évalué l'expression des récepteurs de type I et de type II du TGF- β sur les ostéoclastes.

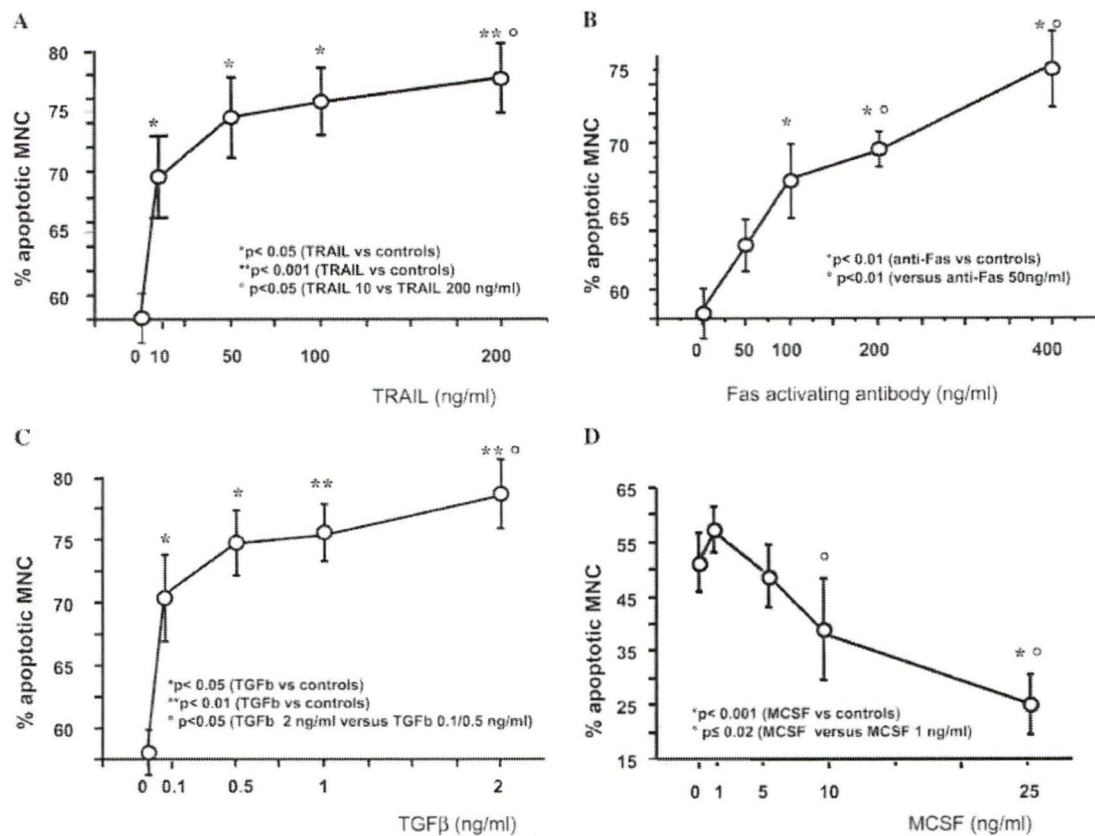


Figure 14 : Apoptose des ostéoclastes humains induite par différents facteurs

À la fin de la culture, les cellules sont incubées dans un milieu dépourvu en M-CSF et RANKL pendant 24 heures. Les cellules sont ensuite traitées avec différentes concentrations de hrTRAIL (10-200 ng/ml) (A), d'anticorps activateur de Fas (50-400 ng/ml) (B), de hrTGF-β (0,1-2 ng/ml) (C) et de M-CSF (1-25 ng/ml) (D) pendant 24 heures. L'apoptose est détectée par marquage au TACS Blue et les résultats sont présentés en pourcentage de CMN apoptotiques.

4.1 Les ostéoclastes humains expriment les récepteurs du TGF- β 1

La transduction de signal du TGF- β 1 implique la liaison du ligand à ses récepteurs de type I et de type II à la surface de la cellule. Pour vérifier la présence de ces deux récepteurs à la membrane, nous avons fait un immunomarquage utilisant des anticorps dirigés contre ces récepteurs (Figure 15).

Dans le cas du récepteur de type I, nous observons un important marquage des CMN comparativement aux contrôles (sérum normal de lapin, non spécifique) (Figure 15-A). Les observations sont semblables pour le récepteur de type II (Figure 15-B). Afin de quantifier les niveaux d'expression des deux types de récepteur dans les ostéoclastes, nous avons compté les pourcentages des CMN positives pour chacun des types de récepteur. $74,0 \pm 4,1\%$ des CMN expriment le récepteur de type I et $69,4 \pm 5,2\%$ des CMN expriment le récepteur de type II (Figure 15-C). Ces résultats confirment ainsi l'expression des récepteurs de type I et II du TGF- β sur la majorité des ostéoclastes humains, suggérant que le TGF- β 1 pourrait avoir une action directe sur les ostéoclastes en se liant à ses récepteurs.

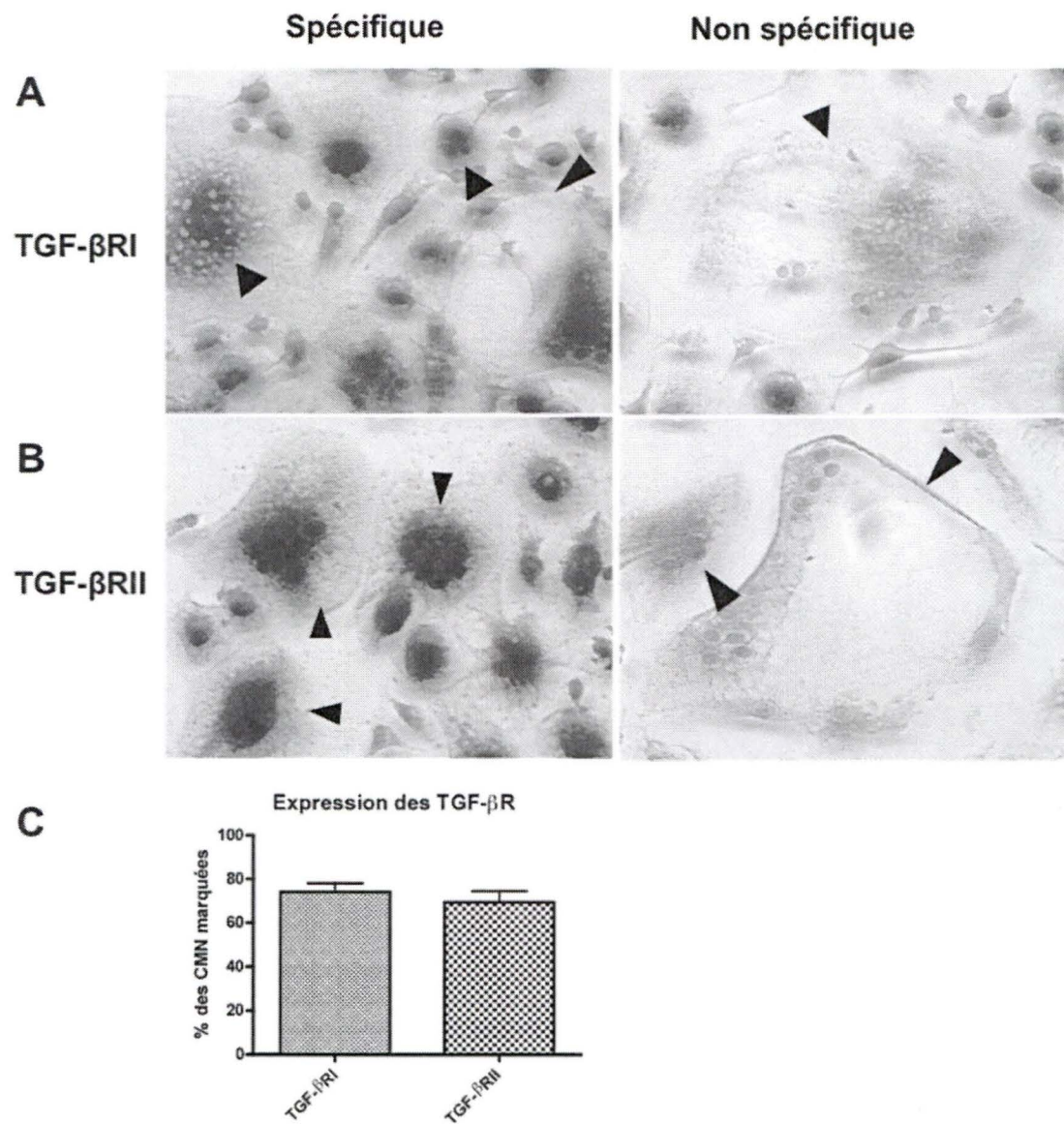


Figure 15: Expression des récepteurs du TGF- β sur les ostéoclastes humains

L'expression des récepteurs du TGF- β a été étudiée par immunocytochimie à l'aide d'anticorps reconnaissant spécifiquement soit le type I ou le type II. Les cellules ont été incubées dans un milieu sans M-CSF et sans RANKL pendant 24 heures et le marquage a été réalisé avec le kit LSAB de Dako. N=4

4.2 Le TGF- β 1 induit l'activation de la caspase 9 dans les ostéoclastes humains

Pour déterminer le mécanisme d'induction de l'apoptose du TGF- β 1 dans les ostéoclastes humains, nous avons tout d'abord identifié quelle voie d'apoptose était activée suite à une stimulation par le TGF- β 1. Sachant que l'activation de la voie extrinsèque implique le clivage de la caspase 8 et que la voie intrinsèque implique le clivage de la caspase 9, nous avons étudié l'expression des caspases 8 et 9 clivées (activées) par immunobuvardage de type Western et par immunocytochimie.

Pour l'analyse par immunobuvardage de type Western (Figure 16), nous avons observé l'évolution de l'activation des caspases 8 et 9 selon différents temps (heures) de stimulation par le TGF- β 1 à concentration de 1 ng/ml. Pour la caspase 8, l'analyse des immunobuvardage de type Western révèle la présence de la procaspase 8 à 57 kDa et de la fraction clivée à 43 kDa correspondant à la caspase 8 active. Nous n'observons pas d'activation de la caspase 8 lorsque les stimulations par le TGF- β 1 se prolongent. Comme contrôle d'activation pour la visualisation de la bande de caspase 8 clivée, une stimulation de 3 heures à la staurosporine (1 μ M) est réalisée, permettant une activation importante de la caspase 8. En effet, il a été montré que la staurosporine, à une concentration de 1 μ M, permet une forte induction de l'apoptose via l'activation de la caspase 8 et de la caspase 9, ce qui en fait un contrôle positif de l'apoptose (Belmokhtar *et al.*, 2001). Dans cette expérience, nous avons focussé sur la bande clivée mesurant 43 kDa comparativement à la bande clivée de 18 kDa vue dans le cas du volet de l'OPG. Ce choix est justifié par le fait qu'il était impossible

de différencier les bandes de 28 et 18 kDa chez la bande correspondant aux cellules traitées à la staurosporine dans les expériences du volet II. En effet, lors d'une stimulation à la staurosporine, la bande à 18 kDa prend de l'expansion et celle-ci s'emboîte avec la bande de non spécifique à 28 kDa rendant impossible de faire le dosage par densitométrie du contrôle de la staurosporine. Donc, pour le volet II, nous montrons les résultats d'immunobuvardage avec la bande de 43 kDa seulement afin de visualiser les effets des stimulants (TGF- β et la staurosporine) sur nos cellules et nous quantifions par immunocytochimie les cellules exprimant la caspase 8 active (voir résultats figure 17). La quantification par immunocytochimie nous permettra de détecter des niveaux plus faibles de caspase 8 active dans les cellules comparativement à l'immunobuvardage et elle permet d'évaluer les effets du TGF- β et de la staurosporine sur nos cellules dans une même expérience.

Pour la caspase 9, nous observons, comme dans le cas de la caspase 8, la procaspase 9 à 47 kDa et les deux bandes clivées de la caspase 9 à 35 et 37 kDa. Une stimulation par le TGF- β 1 à 1 ng/ml permet d'augmenter la quantité de caspase 9 clivée selon les temps de stimulation, correspondant à une augmentation de l'activation de la caspase 9 lors de l'induction de l'apoptose. De plus, nous avons fait une stimulation à la staurosporine 1 μ M pendant 3 heures permettant ainsi de visualiser l'effet de l'apoptose sur l'activation de la caspase 9. Nous avons effectué une normalisation des niveaux de protéines à l'aide de l'actine.

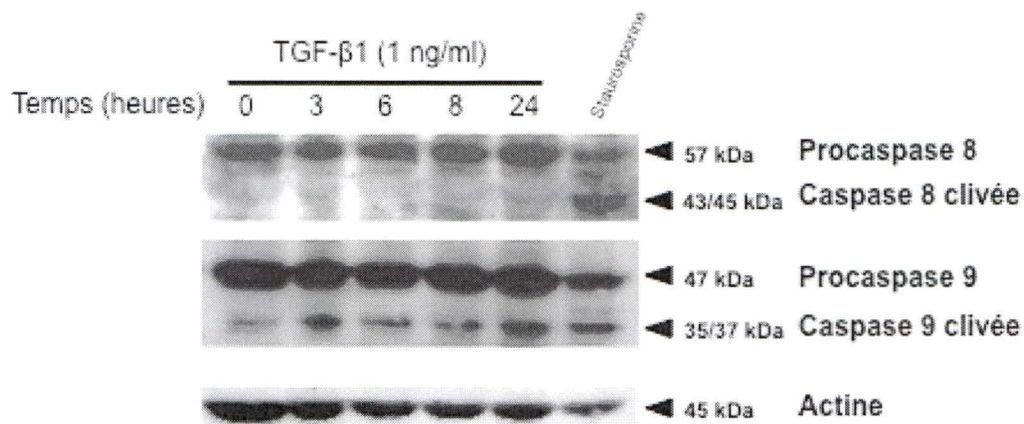


Figure 16 : Activation des caspases par immunobuvardage de type Western

À la fin de la culture, les cellules sont mises en présence d'un milieu sans M-CSF et sans RANKL pendant 24 heures et sont traitées par la suite au TGF-β1 (1 ng/ml) entre 0 et 24 heures. L'analyse par Western de la caspase 8 permet d'observer la procaspase 8 à 57 kDa et les bandes clivées à 43 et 45 kDa qui correspondent aux bandes de la caspase 8 activée. L'analyse de la caspase 9 permet d'observer la procaspase à 47 kDa et les bandes clivées (caspase 9 active) à 35 et 37 kDa. Pour l'actine, la bande apparaît à 45 kDa. N=6

L'absence d'activation de la caspase 8 associée à l'augmentation de l'activation de la caspase 9 selon les temps de stimulation au TGF- β 1 semble nous indiquer que l'apoptose induite par le TGF- β 1 serait d'origine intrinsèque.

L'immunobuvardage de type Western permet de faire l'analyse de l'activation des caspases dans l'ensemble des cellules en culture. Par contre, la culture d'ostéoclastes humains à partir de sang de cordon ombilical ne permet pas d'obtenir une culture homogène d'ostéoclastes. En effet, il existe toujours un pourcentage résiduel de cellules monocytaires non différenciées en ostéoclastes. Pour nous assurer que l'activation de la caspase 8 et de la caspase 9 peut être corrélée à celles des ostéoclastes de la culture, nous avons évalué les niveaux d'activation des caspases en immunocytochimie pour cibler seulement les CMN. De plus, l'immunocytochimie nous permet de refaire l'expérience avec les contrôles adéquats et de pouvoir quantifier l'action de ces contrôles. Les marquages des caspases 8 et 9 ont été effectués à l'aide d'anticorps qui reconnaissent spécifiquement les fractions clivées de la caspase 8 ou celle de la caspase 9. À la figure 17, nous observons des images provenant d'immunocytochimie d'ostéoclastes marqués pour la caspase 8 active (à gauche) et pour la caspase 9 active (à droite). Pour la caspase 8, nous remarquons que l'intensité du marquage des CMN n'est pas augmentée ni diminuée suite à la stimulation par le TGF- β 1 à concentration de 1 ng/ml (17-B) comparativement aux cellules non-traitées (17-A). La stimulation par la staurosporine 1 μ M pendant 3 heures utilisée comme contrôle positif, induit une augmentation du marquage de la caspase 8 dans les CMN (17-C).

Pour la caspase 9, une augmentation de l'activation de la caspase 9 est observée dans les CMN suite à la stimulation par le TGF- β 1 (17-E) comparativement aux CMN non traitées (17-D) et une augmentation de l'activation de la caspase 9 est observée après stimulation par la staurosporine 1 μ M pendant 3 heures (17-F). Pour quantifier ces observations, nous avons effectué le comptage des CMN positives, c'est à dire exprimant les caspases actives par rapport au nombre total de CMN en culture (17-G-H). Dans le cas de l'activation de la caspase 8, le pourcentage de CMN marquées n'était pas modifié suite à la stimulation par le TGF- β 1. Ces pourcentages allaient de $42,4 \pm 3,6$ % à $37 \pm 4,0$ % de CMN marquées par l'anticorps anti-caspase 8 clivée pour les cellules non traitées ou traitées par le TGF- β 1 jusqu'à 24 heures de stimulation. Par contre, il y avait une augmentation significative du nombre de CMN exprimant la caspase 9 clivée en fonction du temps de stimulation au TGF- β 1. $39,5 \pm 2,6$ % de CMN exprimaient la caspase 9 activée en l'absence de TGF- β 1, ce pourcentage augmentait significativement à $52,9 \pm 1,6$ % ($p=0,008$) après 6 heures de stimulation et à $52,0 \pm 1,8$ % ($p=0,014$) de CMN marquées après 24 heures.

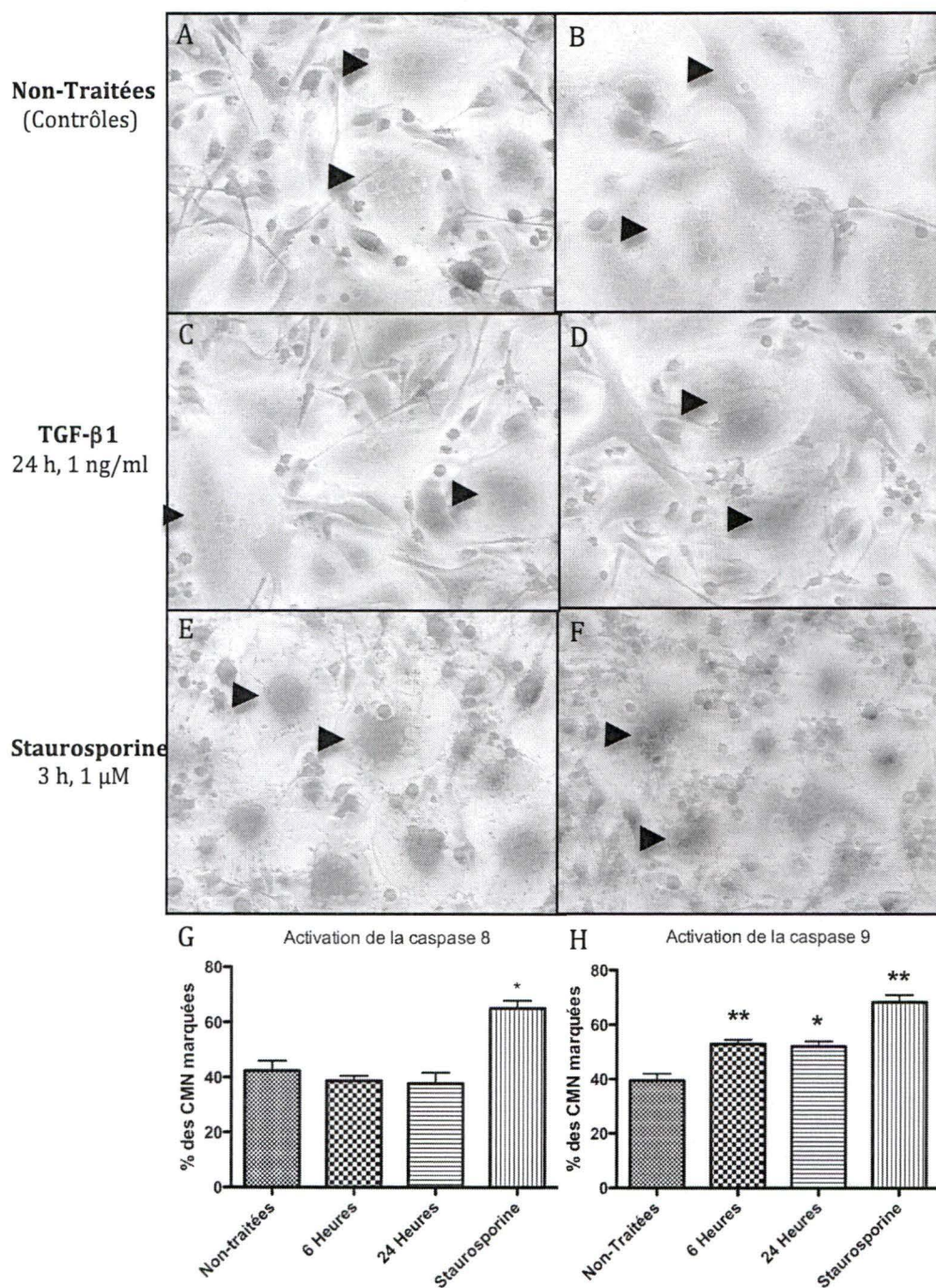


Figure 17 : Activation des caspases évaluée par immunocytochimie

À la fin de la culture, les cellules sont mises en présence de milieu sans M-CSF et sans RANKL pendant 24 heures. Des traitements au TGF-β1 (1 ng/ml) pour une période de 0 à 24 heure, et à la staurosporine à 1 μM pendant 3 heures ont été effectués. Le marquage des

caspases actives a été fait à l'aide d'anticorps spécifiques dirigés contre les formes clivées (actives) de la caspase 8 (A-C) et de la caspase 9 (B-D), ou avec des Ig non spécifiques pour les contrôles (résultats non montrés), et l'immunocytochimie a été effectuée avec le kit LSAB (DAKO). La quantification a été faite par comptage des CMN positives et les résultats sont présentés en pourcentage de CMN positives. N=7

Dans le cas de la caspase 8 comme dans le cas de la caspase 9, le décompte des CMN suite à un traitement à la staurosporine à 1 μ M de 3 heures permettait d'augmenter significativement le pourcentage de CMN marquées ($65,1 \pm 2,8$ % ($p=0,04$) pour la caspase 8 clivée et $68,3 \pm 2,7$ % ($p=0,008$) pour la caspase 9 clivée). Ainsi, les résultats obtenus par immunocytochimie comparés à ceux obtenus à partir des immunobuvardages de type Western, suggèrent que les variations d'activation des caspases obtenues en Western reflètent l'activation des caspases des ostéoclastes.

Afin de confirmer l'activation de la caspase 9 lors de l'apoptose des ostéoclastes suite à une stimulation par le TGF- β 1, nous avons évalué les niveaux d'apoptose en présence d'inhibiteurs de caspases dans les cultures d'ostéoclastes humains (Figure 18). Par la technique de TUNEL, nous obtenons un niveau de base d'apoptose de $33,6 \pm 3,4$ % chez les CMN cultivées en absence de RANKL et de M-CSF pour une période de 48 heures. Suite à une stimulation par le TGF- β 1 (1 ng/ml) de 24 heures, $48,8 \pm 3,0$ % ($p=0,008$) des CMN sont apoptotiques, objectivant l'apoptose des ostéoclastes induite par le TGF- β 1. L'ajout de Z-LEHD, un inhibiteur de caspase 9, dans les deux mêmes conditions inhibe l'induction de l'apoptose par le TGF- β 1 ($36,6 \pm 4,4$ % sans TGF- β 1 vs $37,1 \pm 2,2$ % avec TGF- β 1). D'un autre côté, si nous ajoutons du Z-IETD qui est un inhibiteur de caspase 8, l'induction de l'apoptose induite par le TGF- β 1 persiste.

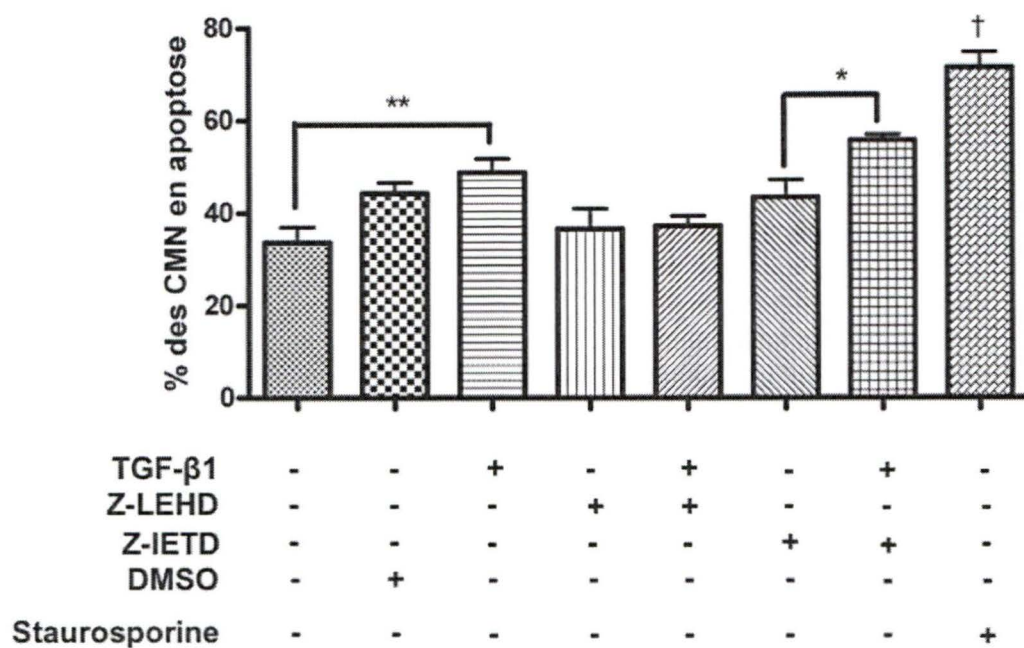


Figure 18: Apoptose des ostéoclastes en présence d'inhibiteur de caspases

À la fin de la culture, les cellules ont été mises en présence d'un milieu sans M-CSF et sans RANKL pendant 24 heures. Les stimulations sont d'une durée de 24 heures post-déprivation. Les concentrations utilisées : TGF-β1 1 ng/ml, Z-LEHD (inhibiteur de caspase 9) 10 μM, Z-IETD (inhibiteur de caspase 8) 10 μM, DMSO 8 μL, Staurosporine 1 μM. L'apoptose est détectée par marquage au TACS Blue et les résultats sont présentés en pourcentage de CMN apoptotiques. N=8

En effet, avec seulement le Z-IETD, $43,3 \pm 3,8$ % des CMN sont apoptotiques alors que ce niveau augmente à $55,6 \pm 1,2$ % ($p=0,03$) dans les CMN en présence de Z-IETD et de TGF- β 1. Une stimulation au DMSO a été utilisée en terme de contrôle. En effet, le DMSO était le véhicule pour les inhibiteurs de caspases et nous pouvons observer que celui-ci augmente l'apoptose des ostéoclastes mais que la présence des inhibiteurs de caspases diminue l'apoptose des ostéoclastes. Ces résultats confirment une fois de plus que le TGF- β 1 mène à l'activation de la caspase 9 dans les CMN.

La conjugaison des résultats de Western, d'immunocytochimie et d'apoptose par TUNEL suggère fortement que le TGF- β 1 à une concentration de 1 ng/ml induit l'apoptose des ostéoclastes humains par l'activation de la voie intrinsèque.

4.3 Transduction du signal du TGF- β 1 chez les ostéoclastes humains

Nous avons donc montré que le TGF- β 1 induisait l'apoptose des ostéoclastes humains par la voie mitochondriale ou intrinsèque, impliquant l'activation de la caspase 9. Par contre, l'activation de la caspase 9 n'est pas le résultat de l'action directe des récepteurs du TGF- β sur les procaspases 9. La liaison du TGF- β 1 à son récepteur mène normalement à la dimérisation du récepteur de type I et de type II menant à l'activation de voies de signalisation et conduisant à des actions spécifiques dans la cellule. Dans les autres types cellulaires, le TGF- β 1 est connu pour activer la voie des Smad et la voie des MAPK (Introduction section 1.4.2), en revanche, les

voies activées par le TGF- β 1 n'ont pas été décrites chez les ostéoclastes humains, dans un contexte d'induction de l'apoptose.

Afin de déterminer quelles voies de signalisation sont impliquées suite à une stimulation par le TGF- β 1, les ostéoclastes humains différenciés à partir de monocytes de cordon ombilical, ont été déprivés en M-CSF et en RANKL pendant 24 heures, conditions d'étude de l'apoptose dans notre modèle. Suite à cette déprivation, des stimulations ont été effectuées avec du TGF- β 1 à une concentration de 1 ng/ml pendant des temps de 0 à 180 minutes, afin d'analyser les voies de signalisation activées de façon précoce ou plus tardive. Les états de phosphorylation des protéines impliquées dans la signalisation intracellulaire ont été étudiés par immunobuvardage de type Western, en utilisant des anticorps dirigés contre les protéines phosphorylées ou non.

La première MAPK qui a été évalué est la JNK, et la stimulation par le TGF- β 1 ne semblait pas modifier significativement la phosphorylation de cette MAPK chez les ostéoclastes humains déprivés en facteur de stimulation (Figure 19). En effet, la normalisation de l'intensité des bandes obtenues pour la JNK 1/2phosphorylée avec celle des bandes non-phosphorylées respectives, permet d'objectiver un niveau constant de phosphorylation suite aux différents temps de stimulation. Les niveaux de phosphorylation sont représentés sur l'image de Western (19-A). D'autre part, le graphique (19-B) représente l'intensité relative des bandes phosphorylées avec une normalisation avec la bande non-phosphorylée.

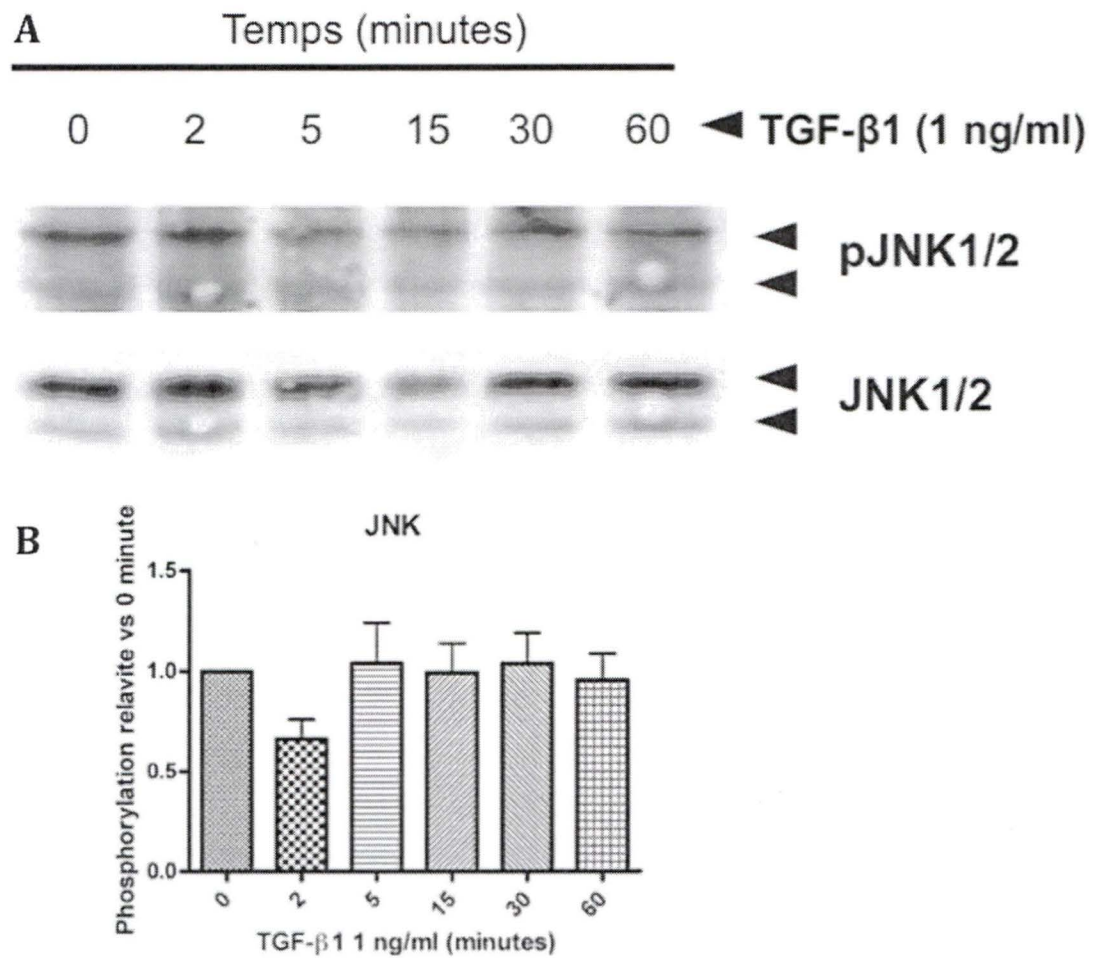


Figure 19 : Phosphorylation de JNK par le TGF- β 1

À la fin de la culture, les cellules sont mises en présence d'un milieu sans M-CSF et sans RANKL. Des stimulations par le TGF- β 1 (1 ng/ml) ont été effectuées entre 0 et 60 minutes et A) l'analyse de la phosphorylation de JNK a été faite par Western à l'aide d'anticorps contre phospho-JNK (1/2) et JNK(1/2) non phosphorylée et B) les résultats sont présentés en phosphorylation relative par rapport au temps 0. N=3

La phosphorylation d'autres composantes impliquées dans la signalisation du TGF- β 1 a été évaluée (ERK, p38 et Smad2). La stimulation par le TGF- β 1 à une concentration de 1 ng/ml entraînait une activation différentielle de ces voies selon le temps (Figure 20). En effet, le TGF- β 1 induisait tout d'abord une augmentation de la phosphorylation de la MAPK ERK entre 2 et 5 minutes suivant l'ajout du TGF- β 1 (20-A), avec une augmentation de l'intensité des bandes phosphorylées dans les cellules stimulées pendant des temps de 2 à 5 minutes par le TGF- β 1. La phosphorylation de ERK semblait diminuer en dessous du niveau basal (temps 0 minute) après 30 à 60 minutes de stimulation. Ces variations dans l'intensité de la phosphorylation de ERK sont représentées aussi par un graphique dans lequel l'intensité des bandes de ERK phosphorylées a été quantifiée et normalisée par l'intensité des bandes de ERK non phosphorylée. Il est bien connu que l'activation de ERK mène à la survie de la cellule (Introduction section 1.3.2), le TGF- β 1 induirait un signal de survie dans les 5 premières minutes de stimulation, mais celui-ci s'estomperait par la suite à partir de 30 minutes de stimulation. Cette diminution du signal pourrait correspondre au début de l'induction de l'apoptose par le TGF- β 1.

ERK n'est pas la seule MAPK activée lors d'une stimulation au TGF- β 1. En effet, simultanément à l'activation de ERK, nous avons aussi observé une augmentation de la phosphorylation de p38 (20-B).

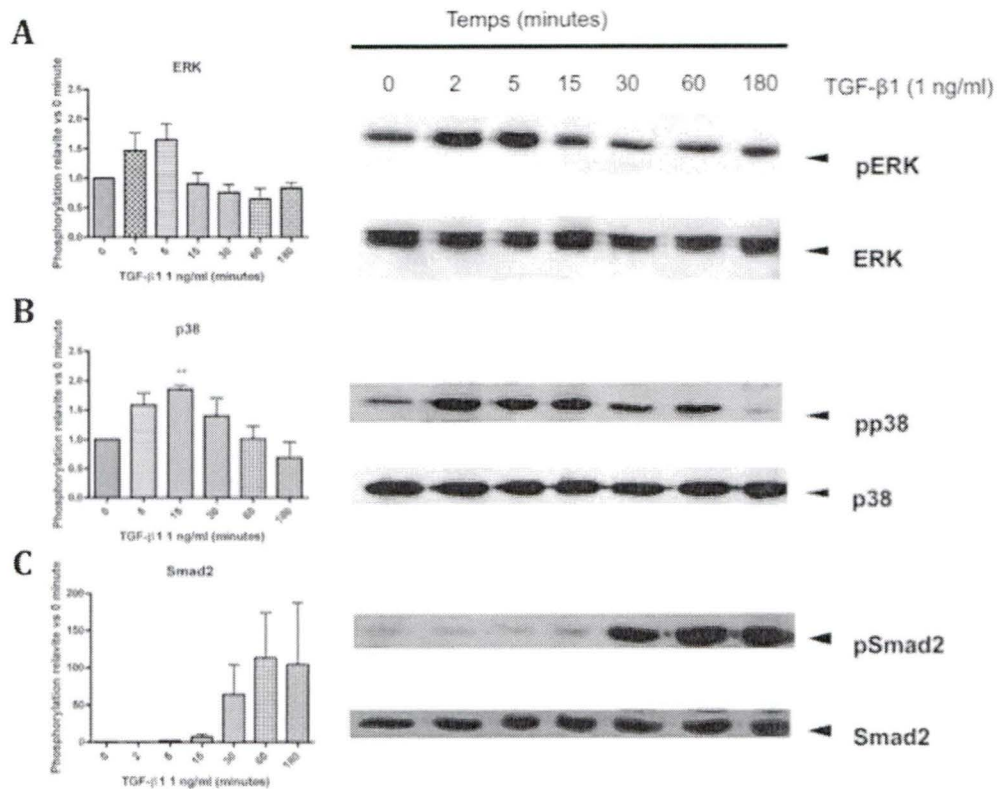


Figure 20 : Phosphorylation de ERK, p38 et Smad2 en présence de TGF- β 1

À la fin de la culture, les cellules sont mises en présence d'un milieu sans M-CSF et sans RANKL. Des stimulations au TGF- β 1 (1 ng/ml) ont été effectuées entre 0 et 60 minutes et les analyses de la phosphorylation de ERK, p38 et Smad2 ont été faites par Western à l'aide d'anticorps contre les protéines phosphorylées et non phosphorylées de chacune des 3 protéines. Les résultats sont présentés en phosphorylation relative par rapport au temps 0. N=5

Une augmentation de l'intensité des bandes phosphorylées de p38 était observée entre 2 et 15 minutes de stimulation par le TGF- β 1. Par quantification de l'intensité relative des bandes phosphorylées, l'activation de p38 était de $1,9 \pm 0,1$ fois ($p=0,007$) plus importante après 15 minutes de stimulation comparativement au niveau basal représenté au temps 0. De façon générale, la phosphorylation de p38 débutait entre 2 et 5 minutes et était maximale à 15 minutes de stimulation. Elle diminuait pour revenir au taux de base à partir de 30 minutes. La MAPK p38 est souvent impliquée dans l'apoptose des cellules surtout lors de stress (Introduction section 1.3.2) donc sachant que le TGF- β 1 active p38 dans les ostéoclastes dans des conditions d'apoptose, cette voie pourrait également participer à l'apoptose de l'ostéoclaste induite par le TGF- β 1.

La voie principale de signalisation du TGF- β 1 est la voie des Smad, et cette activation est caractérisée par une phosphorylation de Smad2 et/ou de Smad3 par les récepteurs du TGF- β . La phosphorylation de Smad2 et 3 permet le recrutement de Smad4 et ce complexe peut migrer au noyau pour induire l'expression de gènes cibles (Introduction section 1.4.2.1). Donc pour vérifier l'activation de cette voie, nous avons regardé les niveaux de phosphorylation de Smad2 dans les cultures d'ostéoclastes stimulés par le TGF- β 1 (Figure 20-C). Suite à une stimulation par le TGF- β 1, nous observons une importante augmentation de la phosphorylation de Smad2 à partir de 30 minutes jusqu'à 3 heures de stimulation. Cette importante augmentation peut aussi être observée lors de la quantification de l'intensité des bandes, et nous pouvons observer qu'il y a une augmentation de la phosphorylation

de Smad2 d'environ 100 fois par rapport au niveau basal représenté au temps 0. L'induction de l'apoptose par le TGF- β 1 peut être dépendante de la voie des Smad comme cela a été démontré dans quelques types cellulaires (Introduction section 1.4.3.1). Ainsi, l'activation de la voie des Smad par le TGF- β 1 dans les ostéoclastes humains en condition d'apoptose pourrait aussi participer à l'apoptose des ostéoclastes humains induite par le TGF- β 1.

Comme nous pouvons l'observer, la stimulation par le TGF- β 1 des ostéoclastes humains cultivés en absence de facteurs de survie, M-CSF et RANKL, mène à une série d'événements dans la cellule. Différentes activations de voies de signalisation intracellulaire se produisent dans le temps. Comme il est résumé à la figure 21, nous observons une activation de ERK entre 2 et 5 minutes suivant l'ajout du TGF- β 1, et il y a un abaissement en dessous du niveau basal après 30 minutes de stimulation. De plus, nous observons une activation significative de p38 entre 5 et 15 minutes suivie par une importante activation de la voie des Smad à partir de 30 minutes. La diminution de l'activité de ERK en dessous du niveau basal combinée avec l'activation de p38 et de la voie des Smad peuvent expliquer l'induction de l'apoptose des ostéoclastes par la voie intrinsèque.

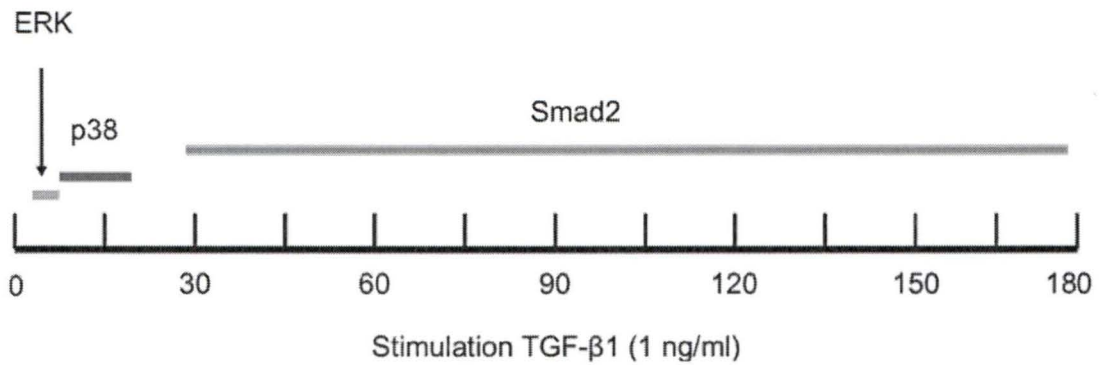


Figure 21 : Ligne du temps de la signalisation du TGF-β1 chez l'ostéoclaste humain.

Récapitulatif de l'activation des voies de signalisation par le TGF-β1 chez les ostéoclastes humains. ERK est activée rapidement (2-5 minutes), suivie de l'activation de p38 à 15 minutes et de celle de la voie des Smad activée à partir de 30 minutes. JNK n'est pas activé par le TGF-β1.

4.4 Le TGF- β 1 augmente l'expression de Bax et de Bim

Dans la section précédente, nous avons vu que le TGF- β 1 induisait l'activation de voies de signalisation (ERK, p38 et Smad2) pouvant avoir des liens avec l'apoptose. En effet, la stimulation de ces voies de signalisation peut induire l'apoptose d'une cellule par la modulation d'expression d'homologues Bcl-2 par exemple (Introduction section 1.3). Pour vérifier si les homologues Bcl-2 pourraient être impliqués dans l'apoptose des ostéoclastes humains induite par le TGF- β 1, nous avons étudié les niveaux d'expression de certains homologues Bcl-2 souvent modulés par le TGF- β 1. Nous avons évalué par immunobuvardage de type Western l'expression d'une protéine anti-apoptotique, Bcl-2, et de trois protéines anti-apoptotiques, Bid, Bax et Bim. Les stimulations étaient chaque fois précédées d'une déprivation en M-CSF et en RANKL pendant 24 heures, et les stimulations par le TGF- β 1 ont été faites à différents temps entre 0 et 24 heures à une concentration de 1 ng/ml.

Les résultats d'expression de Bcl-2 et de Bid évaluées par Western sont montrés à la figure 22. Les niveaux d'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 (22-A) et pro-apoptotique Bid (22-B) n'étaient pas modifiés suite à la stimulation par le TGF- β 1. En effet, la quantité de protéine de ces deux homologues Bcl-2 détectée en Western était constante après les stimulations. La mesure de l'intensité des bandes normalisée avec celle des bandes d'actine permet de confirmer que le

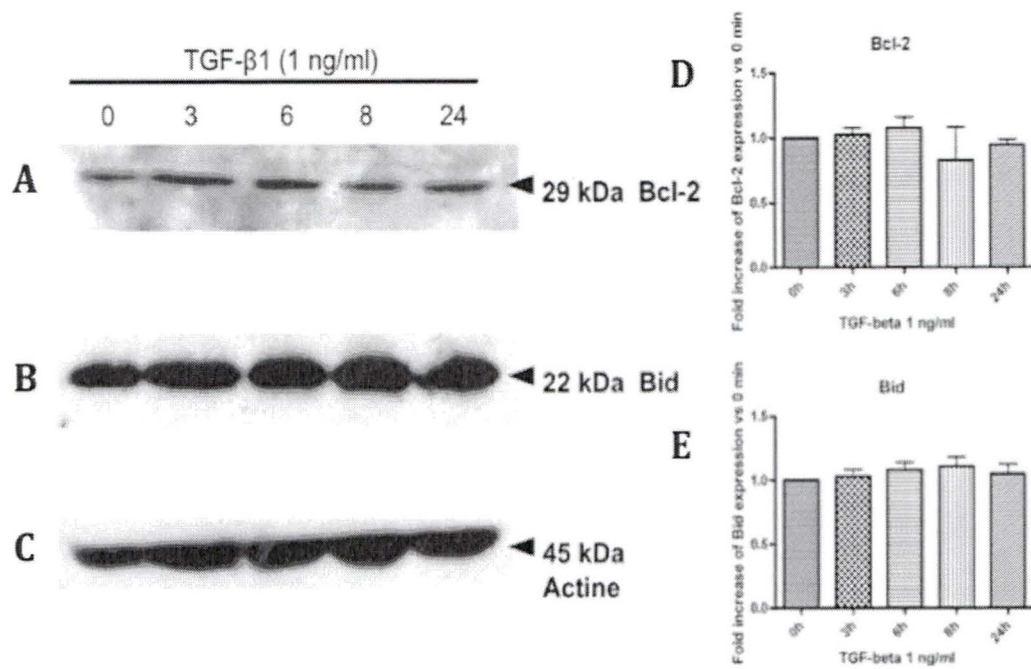


Figure 22 : Expression de Bcl-2 et de Bid évaluée par Western

À la fin de la culture, les cellules sont mises en présence d'un milieu sans M-CSF et sans RANKL. Des stimulations par le TGF-β1 (1 ng/ml) ont été effectuées entre 0 et 24 heures et les analyses d'expression des homologues Bcl-2 ont été faites à l'aide d'anticorps contre Bcl-2 et Bid spécifiquement (A-C). Les résultats sont présentés en expression relative par rapport au temps 0 (D-E). N=4

TGF- β 1 n'induisait pas de changement dans l'expression de Bcl-2 et de Bid (22-D, 22-E).

Par contre, concernant l'expression des homologues pro-apoptotiques Bax et Bim, la stimulation par le TGF- β 1 augmentait l'expression de ces deux homologues (Figure 23). Une augmentation de l'expression de Bax et de Bim était objectivable à des temps de 6 à 8 heures de stimulation. Dans chacun des cas, la quantification de l'intensité des bandes normalisée avec la quantité d'actine permettait de visualiser une tendance à la hausse dans l'expression de Bax (23-D). En effet, nous observons une augmentation jusqu'à 6 heures pour obtenir un niveau de $1,35 \pm 0,23$ fois plus d'expression de Bax comparativement au temps 0. Pour l'homologue Bim (23-E), l'élévation d'expression se faisait entre 0 et 6 heures pour obtenir un niveau significativement plus élevé qu'au temps 0 heure. En effet, Bim était $3,52 \pm 0,28$ ($p < 0,005$) fois plus exprimé après 6 heures de stimulation par le TGF- β 1. Sachant que Bim et Bax sont des homologues Bcl-2 pro-apoptotiques qui favorisent l'apoptose de la cellule via le clivage de la caspase 9, l'augmentation d'expression par le TGF- β 1 de ces deux homologues suggère qu'ils pourraient être impliqués dans l'apoptose des ostéoclastes humains par la voie intrinsèque induite par le TGF- β 1.

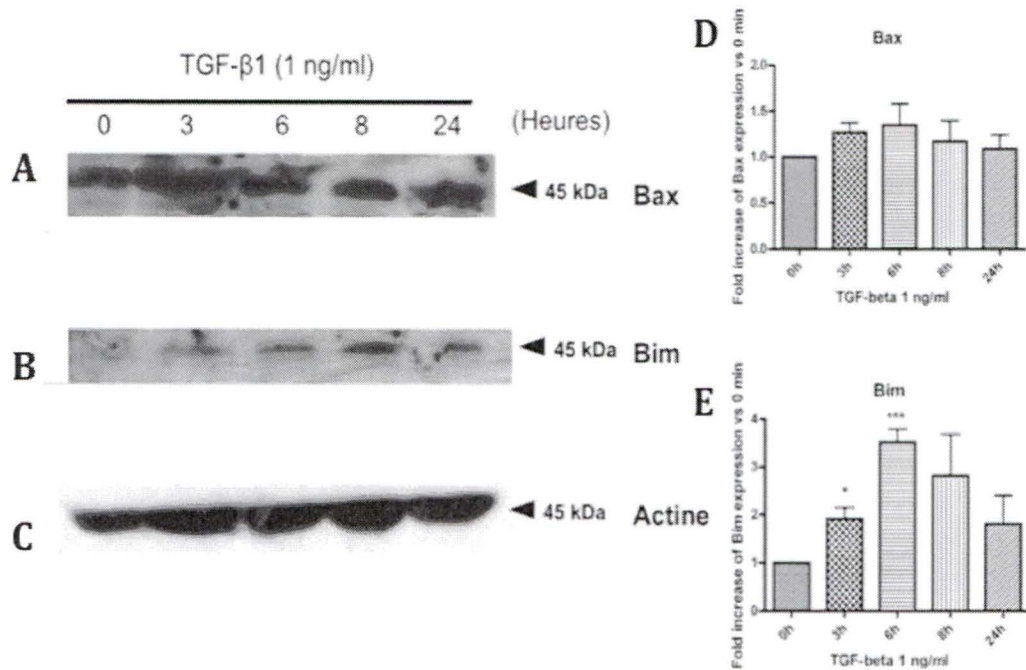


Figure 23 : Expression de Bax et de Bim évaluée par Western

À la fin de la culture, les cellules sont mises en présence d'un milieu sans M-CSF et sans RANKL. Des stimulations au TGF- β 1 (1 ng/ml) ont été effectuées entre 0 et 24 heures et les analyses d'expression des homologues Bcl-2 ont été faites à partir d'anticorps contre Bax et Bim spécifiquement (A-C). Les résultats sont présentés en expression relative par rapport au temps 0 (D-E). N=4

5 Discussion

Des changements dans la balance entre la survie et de l'apoptose des ostéoclastes peut mener à des changements cruciaux de la résorption osseuse et du remodelage de l'os, et engendrer des anomalies de sa structure. Des altérations de l'apoptose des ostéoclastes peuvent être impliquées dans certaines pathologies où il existe une hyperrésorption osseuse, comme l'ostéoporose ou l'ostéolyse maligne. Plusieurs facteurs locaux et systémiques régulent la résorption osseuse. Par exemple, les hormones telles que la PTH, la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, les cytokines, telles que l'IL- 1β , le TNF- α , ou encore la PGE_2 augmentent la résorption osseuse, alors que l'IL-4, l'INF- γ , le TGF- β et les estrogènes la diminuent. De plus, la modulation de la résorption osseuse peut impliquer d'autres types cellulaires présents dans l'environnement de l'os. En effet, la régulation de la formation, de l'activité et de la survie d'un ostéoclaste est principalement le résultat du ratio entre le RANKL/OPG, facteurs produits par les ostéoblastes et les cellules stromales médullaires. Les facteurs systémiques augmentant la résorption osseuse agissent de façon générale en augmentant l'expression de RANKL et en diminuant celle de l'OPG, et à l'inverse, ce ratio diminue avec les facteurs inhibant la résorption osseuse. Toutefois, certains facteurs peuvent avoir des actions directes sur l'ostéoclaste. En particulier, des études ont montré que le TGF- β , les estrogènes et l'OPG peuvent induire l'apoptose des ostéoclastes chez la souris (Hughes et al., 1996, Saintier et al., 2006, Shiotani *et al.*, 2002). L'apoptose des ostéoclastes étant une étape importante dans la régulation de la résorption osseuse, affectant le nombre de précurseurs et d'ostéoclastes matures

(Hughes & Boyce, 1997), il était important d'étudier ce processus, et d'évaluer l'action directe de facteurs locaux tels que l'OPG et le TGF- β sur les ostéoclastes humains. La plupart des études ont été effectuées dans des modèles murins avec des systèmes de coculture impliquant des ostéoblastes pour la différenciation des ostéoclastes. Le but de notre étude était de déterminer les effets directs de ces deux facteurs sur l'apoptose des ostéoclastes humains.

Nous travaillons sur les ostéoclastes humains obtenus suite à la différenciation des cultures primaires de monocytes fœtaux isolés de sang de cordon ombilical. L'intérêt de travailler avec un modèle humain provient du fait que les systèmes murins et humains peuvent différer en plusieurs points, et les résultats s'appliqueront plus aux pathologies humaines. Toutefois, ce modèle a quelques inconvénients : le temps de différenciation est long (3 semaines), et la disponibilité des cellules primaires dépend de celle des sangs de cordon au Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke (CHUS). L'étude de l'apoptose a ainsi été effectuée sur des ostéoclastes humains différenciés à partir de monocytes fœtaux. Lorsque différenciés en présence de M-CSF et de RANKL, ces monocytes deviennent des cellules multinucléées exprimant RANK, CTR, l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et TRAP qui sont des marqueurs phénotypiques des ostéoclastes matures. De plus, ces cellules multinucléées sont capables de résorber l'os, caractéristique principale de ce type cellulaire (Hodge *et al.*, 2004, Roux *et al.*, 2005, Roux *et al.*, 1996). L'apoptose des ostéoclastes a été étudiée dans des conditions optimales pour observer ce phénomène, à savoir en diminuant la concentration de sérum dans le milieu de

culture et en retirant les facteurs de survie ostéoclastique, M-CSF et RANKL (Jimi *et al.*, 1995, Lacey *et al.*, 2000). Il a en effet été montré qu'un milieu de culture dépourvu de ces facteurs pouvait induire l'apoptose des ostéoclastes (Okahashi *et al.*, 1998). Par ailleurs, dans un système de différenciation en coculture, la séparation des ostéoclastes et des ostéoblastes induisait l'apoptose des cellules résorbantes, du fait d'une perte des facteurs de survie ostéoclastique produits par les ostéoblastes (Fukuda *et al.*, 2005). Dans notre travail, nous avons utilisé un milieu d'induction d'apoptose contenant la moitié de la concentration en sérum habituellement utilisée, et sans facteur de survie ostéoclastique. De plus, cette technique d'étude de l'apoptose a déjà été validée dans d'autres travaux du laboratoire (Chamoux *et al.*, 2008, Roux *et al.*, 2005).

In vivo, la perte de stimulation par le RANKL entraîne une diminution de la résorption osseuse, en partie liée à une augmentation de l'apoptose des ostéoclastes. Ce défaut de stimulation par RANKL peut être secondaire à une augmentation de l'expression d'OPG, à une diminution d'expression de RANKL, ou à l'administration d'un inhibiteur de RANKL, anticorps anti-RANKL ou RANK soluble, permettant de séquestrer le RANKL (Lacey *et al.*, 2000, Schwarz & Ritchlin, 2007). Ceci illustre que nos conditions d'étude de l'apoptose des ostéoclastes *in vitro* sont en accord avec les états d'induction de l'apoptose des ostéoclastes observés *in vivo*.

L'OPG est un membre soluble de la famille des récepteurs du TNF dont le ligand est RANKL. Donc, une augmentation de l'OPG dans l'environnement de l'ostéoclaste pourrait diminuer la formation et l'activité des ostéoclastes, tout en augmentant l'apoptose des ostéoclastes, via la séquestration du RANKL. Par ailleurs, en plus d'agir en inhibant la voie RANKL, l'OPG pourrait avoir des actions directes sur l'ostéoclaste (Wittrant *et al.*, 2002). Nous avons évalué les effets directs potentiels de l'OPG sur l'apoptose des ostéoclastes humains. Les résultats obtenus suggéraient que l'OPG diminuait l'apoptose des ostéoclastes humains. Ces résultats semblaient surprenants, car l'OPG est considérée comme étant un inhibiteur important de la résorption osseuse, indirectement en inhibant RANKL, et directement en diminuant l'expression de TRAP et de la cathepsine K (Boyce & Xing, 2008, Wittrant *et al.*, 2002).

Nous avons expliqué cette baisse du niveau d'apoptose des ostéoclastes induite par l'OPG par la présence de son deuxième ligand, TRAIL, dans le milieu de culture. En effet, TRAIL est le 2^{ème} ligand de l'OPG qui est le cinquième récepteur pour TRAIL (Emery *et al.*, 1998). De plus, TRAIL a été impliqué dans l'apoptose des ostéoclastes humains (Colucci *et al.*, 2007, Roux *et al.*, 2005). Pour comprendre l'effet de l'OPG sur la diminution de la mort cellulaire des ostéoclastes, nous avons démontré que les ostéoclastes exprimaient et sécrétaient TRAIL et qu'en absence de facteurs de survie, cette expression de TRAIL était augmentée dans le microenvironnement de la cellule. TRAIL induit l'apoptose des ostéoclastes via l'activation de la voie extrinsèque de l'apoptose, en activant ses récepteurs de mort à

la membrane cellulaire, avec une activation subséquente de la caspase 8. De manière intéressante, nous avons montré que la présence d'OPG permettait de diminuer l'activation de la caspase 8 impliquée dans l'apoptose d'origine extrinsèque. Ceci illustre encore une fois l'importance de TRAIL dans l'apoptose des ostéoclastes et sa régulation possible par l'OPG présente dans le milieu.

Depuis quelques années, l'implication de TRAIL dans la régulation de l'apoptose des ostéoclastes a été soulignée. L'induction de l'apoptose par TRAIL peut être modulée par la présence ou l'absence d'inhibiteur intracellulaire d'apoptose comme FLIP (Griffith *et al.*, 1998). De plus, l'activité de NF- κ B pourrait avoir un rôle important dans la sensibilité à l'apoptose induite par les récepteurs de mort (Harper *et al.*, 2001, Rivera-Walsh *et al.*, 2000). Enfin, la modulation de l'expression des récepteurs leurres (TRAIL-R3 et TRAIL-R4) pourrait aussi participer à la sensibilité de la cellule aux signaux d'apoptose induits par TRAIL. Par exemple, dans l'ostéolyse maligne, une expression plus élevée des récepteurs leurre de TRAIL à la surface des ostéoclastes a été décrite, ce qui pourrait rendre compte d'une résistance des ostéoclastes à l'apoptose dans ces conditions et expliquer la résorption accrue (Colucci *et al.*, 2004, Roux *et al.*, 2005).

Dans l'environnement de l'os, la liaison de l'OPG avec TRAIL ou RANKL peut dépendre d'une compétition. La liaison de l'OPG à TRAIL ou à l'OPG pourrait dépendre de la concentration relative de ces facteurs, avec une affinité plus grande pour TRAIL lorsque RANKL est présent à faible concentration. De plus, l'OPG

semble avoir moins d'affinité pour TRAIL à la température normale du corps humain (Truneh *et al.*, 2000). Cependant un travail plus récent suggère que l'OPG peut lier TRAIL et RANKL avec une affinité similaire à la température physiologique de 37°C (Vitovski *et al.*, 2007). Nos résultats pourraient ainsi avoir une importance physiologique, et suggèrent que TRAIL, à l'instar de la voie RANKL/OPG, agit comme un facteur important dans la régulation de la survie/apoptose des ostéoclastes.

En conclusion de ce volet, nous avons montré que l'OPG diminuait l'apoptose des ostéoclastes humains lorsque les facteurs de survie, M-CSF et RANKL, font défaut. La déprivation de ses facteurs de survie a pour effet d'augmenter l'expression de TRAIL par les ostéoclastes pour induire l'apoptose de ces cellules, de façon autocrine, et en agissant sur les ostéoclastes environnants. Ces travaux ont permis de découvrir un nouveau mécanisme de régulation de l'apoptose des ostéoclastes via la sécrétion de TRAIL et de déterminer une nouvelle fonction de l'OPG via l'inhibition de l'action apoptotique de TRAIL chez les ostéoclastes humains (Travaux publiés et article en annexe (Chamoux *et al.*, 2008).

Parmi les nombreux facteurs impliqués dans le remodelage osseux, le TGF- β , comme l'OPG, peut moduler la formation de l'ostéoclaste et son apoptose. Le TGF- β stimule la formation ostéoclastique en augmentant l'expression de RANK, de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et du CTR (Fuller *et al.*, 2000, Orcel *et al.*, 1990). De plus, une augmentation de l'expression de NFATc1 pourrait aussi expliquer

l'ostéoclastogénèse accrue induite par le TGF- β (Fox et al., 2008). D'un autre côté, le TGF- β diminue l'activité des ostéoclastes lorsque l'exposition à ce facteur se prolonge. Par ailleurs, le TGF- β diminue l'expression de RANKL et augmente celle de l'OPG par les ostéoblastes dans un système de coculture (Takai et al., 1998), et induit l'apoptose des ostéoclastes par un effet direct sur ces cellules (Hughes et al., 1996, Roux et al., 2005). Donc, le TGF- β augmenterait la production d'ostéoclastes, mais aurait également un effet inhibiteur de la résorption osseuse par l'induction de l'apoptose des ostéoclastes matures. La 2^{ème} partie de notre travail était d'étudier les mécanismes impliqués dans l'apoptose des ostéoclastes induite par le TGF- β , mécanismes actuellement inconnus chez ces cellules.

Les cascades de signalisation pouvant être activées par le TGF- β sont nombreuses, et dépendent des conditions dans lesquelles se trouvent les cellules, en particulier pour induire l'apoptose. Il peut y avoir une activation des voies des «death-associated protein kinase (DAPK)», p38 et JNK, ou encore une activation des Smad. L'activation de ces voies peut mener à la modulation de certains homologues Bcl-2 par exemple Bcl-2, Bcl-xl, Bim et Bax. Pour ce qui est de l'ostéoclaste, nous avons montré que l'induction de l'apoptose est d'origine intrinsèque via l'activation de la caspase 9 et que le clivage de la caspase 9 pourrait être le résultat d'une activation des voies de p38 et des Smad suivie d'une augmentation d'expression de Bax et de Bim.

En premier lieu, nous avons démontré que les ostéoclastes humains exprimaient les récepteurs du TGF- β . L'expression des isoformes des récepteurs du TGF- β avait été mise en évidence sur des cellules multinucléées de tumeurs osseuses à cellules géantes (Franchi *et al.*, 2001, Zheng *et al.*, 1994). Ces cellules géantes sont des ostéoclastes (Roux *et al.*, 1996), mais formés dans un contexte tumoral, et il était important de vérifier l'expression des récepteurs de type I et de type II du TGF- β par les ostéoclastes matures issus de nos cultures.

Suite à la liaison du TGF- β à ses récepteurs, nous avons observé une activation rapide et transitoire de ERK et p38 et une activation plus tardive de la voie des Smad. La présence des deux types de récepteurs est importante pour l'activation des voies de signalisation. TGF- β RI est impliqué dans la transduction de signal alors que le TGF- β RII est impliqué dans la liaison du TGF- β (Zhao *et al.*, 2008), mais les deux récepteurs sont nécessaires pour la transduction de signal induite par le TGF- β (Wrana *et al.*, 1994). L'activation de p38 et des Smad a été observée lors d'induction de l'apoptose dans d'autres types cellulaires (Ramesh *et al.*, 2008, Yoo *et al.*, 2003, Yu *et al.*, 2002). On peut aussi souligner que lors de l'augmentation de la formation ostéoclastique induite par le TGF- β , ces mêmes voies de signalisation sont activées. En effet, l'activation de p38 par le TGF- β augmente l'ostéoclastogénèse et l'activité de résorption osseuse (Karsdal *et al.*, 2001, Karsdal *et al.*, 2003).

Contrairement à nos observations, d'autres études ont montré que le TGF- β favorisait la survie de la cellule. Ces différences peuvent être liées au type cellulaire

utilisé ou, concernant les ostéoclastes, aux autres facteurs de stimulation et de survie présents. En effet, dans l'étude effectuée par Gingery et al. en 2008, dans laquelle ils mentionnent que le TGF- β augmente la survie de l'ostéoclaste, les ostéoclastes d'origine murine sont en présence constante de RANKL, alors que nos stimulations par le TGF- β se font en absence des facteurs de survie (Gingery *et al.*, 2008). Le RANKL est connu pour activer une multitude de voies de signalisation dans l'ostéoclaste (Asagiri & Takayanagi, 2007, Roux, 2007), donc une stimulation concomitante par RANKL et TGF- β pourrait créer des interactions dans la signalisation pouvant expliquer ces effets contraires. Afin de mieux comprendre les effets du TGF- β selon les conditions (avec ou sans facteurs de survie), des études préliminaires sur l'induction de l'apoptose des ostéoclastes par le TGF- β avec et sans RANKL ont été effectuées (résultats non-montrés). Les résultats semblent indiquer que le TGF- β utilisé aux mêmes concentrations n'induit pas l'apoptose des ostéoclastes en présence de RANKL comparativement aux conditions sans RANKL. Ces études devront être confirmées afin de déterminer si les interactions entre les voies de signalisation peuvent expliquer les effets différents du TGF- β selon les études.

De plus, nous avons montré qu'une stimulation par le TGF- β menait à une élévation de l'expression de Bim et de Bax. L'augmentation de la quantité de ces deux homologues Bcl-2 pro-apoptotiques serait l'explication la plus plausible de l'apoptose des ostéoclastes induite par le TGF- β , suivie par l'activation de la caspase 9 secondaire à la perméabilisation de la mitochondrie. Plusieurs études ont souligné

l'implication de Bim et de Bax dans l'induction de l'apoptose par le TGF- β dans d'autres types cellulaires (Clybourn *et al.*, 2008, Motyl *et al.*, 2000, Ramesh *et al.*, 2008, Ramjaun *et al.*, 2007). Dans une autre étude, des analyses par «microarray» ont démontré que la voie de signalisation des Smads était fortement stimulée lors de l'apoptose induite par le TGF- β , et que Bim était nécessaire pour cette induction d'apoptose (Yu *et al.*, 2008). Ceci en ferait le principal acteur de l'induction de l'apoptose par le TGF- β . Toutefois, même si nous avons observé une augmentation de l'expression de Bim par le TGF- β chez les ostéoclastes, nos résultats ne nous permettent pas de confirmer son implication dans l'apoptose observée. Afin de répondre à cette interrogation, nous effectuons des travaux qui permettront de vérifier si l'activation de la caspase 9 est abolie suite à l'inhibition de l'expression de Bim et de Bax à l'intérieur de la cellule. De plus, nous évaluerons également l'expression de Bim et de Bax chez les ostéoclastes suite à une inhibition de la voie des Smad et de p38 pour déterminer si l'induction de l'apoptose est Smad-dépendante ou p38-dépendante.

La régulation du remodelage osseux par le TGF- β est complexe et comprend plusieurs variables. De façon générale, le TGF- β agissant sur le remodelage osseux provient de la matrice osseuse. Il y est déposé par les ostéoblastes lors de la formation osseuse, et est libéré et activé lors de la résorption osseuse. Dans l'environnement dans lequel le TGF- β est libéré, nous retrouvons des ostéoblastes et des ostéoclastes. La littérature semble favoriser un rôle du TGF- β plutôt inhibiteur de la résorption osseuse et stimulateur de la formation osseuse. En effet, ce facteur de

croissance favorise la formation ostéoblastique, diminue le ratio RANKL/OPG (Takai et al., 1998), permettant la diminution de la résorption osseuse tout en augmentant la masse osseuse (Dabovic et al., 2005). L'inhibition de la signalisation du TGF- β *in vivo* par un inhibiteur du récepteur de type I (Mohammad, 2008) ou par un déficit de la «latent TGF- β binding protein 3» (souris KO) (Dabovic et al., 2005), entraîne une augmentation de la masse osseuse. Ceci montre la complexité des actions du TGF- β lorsqu'il est étudié dans des systèmes comprenant une multitude de types cellulaires, et fait également intervenir un rôle du TGF- β dans la formation du squelette. De plus, l'augmentation de la libération du TGF- β de la matrice osseuse dans les modèles murins de métastases osseuses ostéolytiques suggère un rôle de ce facteur dans la résorption osseuse accrue. Mais ici encore, des interférences avec d'autres facteurs sont impliquées, en particulier le TGF- β , dont le rôle dans le développement des métastases osseuses est indéniable, est le principal facteur de croissance tumorale et stimule la production de PTHrP, facteur ostéolytique (Kingsley *et al.*, 2007). Ceci souligne l'importance de comprendre la limitation des études *in vitro* ou *in vivo* chez l'animal avant d'extrapoler à l'homme. Toutefois, cela souligne également que pour comprendre les mécanismes d'action d'un facteur, une des étapes est de bien identifier son rôle au niveau cellulaire. L'analyse de l'ensemble de ces études complémentaires permettra de mieux comprendre les pathologies afin de mieux cibler les stratégies thérapeutiques.

Au cours des dernières années, nous avons travaillé sur l'identification de différents facteurs pouvant induire l'apoptose des ostéoclastes, étape importante dans

la régulation de la résorption osseuse. L'étude des mécanismes impliqués dans l'induction de l'apoptose de l'ostéoclaste, permet d'émettre plusieurs hypothèses pour expliquer certaines pathologies osseuses. Plusieurs pathologies impliquant une hyperrésorption osseuse sont caractérisées par une résistance à l'apoptose des ostéoclastes. La polyarthrite rhumatoïde est caractérisée par une destruction du cartilage et de l'os. Dans un modèle d'arthrite expérimentale, une augmentation de la sévérité de l'arthrite et des destructions ostéo-articulaires était observée chez les souris Bim ^{-/-} comparativement aux souris sauvages, avec une augmentation du nombre de cellules TRAP⁺ dans l'os péri-articulaire (Scatizzi *et al.*, 2006). Dans la maladie de Paget, les ostéoclastes ont une résistance plus élevée à l'apoptose comparativement à des ostéoclastes normaux (Couture *et al.*, 2007). Dans l'ostéolyse maligne, les ostéoclastes pourraient acquérir une résistance à l'apoptose via une modulation de l'expression des récepteurs leurres de TRAIL (Roux *et al.*, 2005), la voie de TRAIL étant impliquée dans la régulation autocrine des ostéoclastes humains (Chamoux *et al.*, 2008). Ceci illustre que l'apoptose des ostéoclastes est un mécanisme important de régulation de la résorption osseuse et une dérégulation de ce processus pourrait jouer un rôle majeur dans les anomalies osseuses de différentes pathologies chez l'homme.

En conclusion, nous avons démontré, lors de ces travaux, deux mécanismes de régulation de l'apoptose des ostéoclastes. En premier lieu, nous avons démontré que les ostéoclastes exprimaient TRAIL, et que cette expression était augmentée en absence des facteurs de survie M-CSF et RANKL. L'augmentation de cette

expression a pour effet d'induire l'apoptose des ostéoclastes environnants. De plus, nous avons démontré que l'OPG pouvait diminuer l'apoptose induite par le TRAIL via l'inhibition de l'activité du TRAIL dans l'environnement. En deuxième lieu, nous avons démontré que le TGF- β induit l'apoptose des ostéoclastes humains via la voie intrinsèque de l'apoptose et que cette apoptose pourrait être induite par l'activation de la voie de p38 et des Smad suivis par une augmentation d'expression de Bax et de Bim. Cette induction de l'apoptose par le TGF- β pourrait aussi être un mécanisme de régulation physiologique, car le TGF- β peut être libéré de la matrice osseuse lors de la résorption osseuse. Pour compléter cette étude de régulation de l'apoptose de l'ostéoclaste induite par le TGF- β , nous étudions maintenant les niveaux d'expression des récepteurs du TGF- β avant et après la déprivation en facteurs de survie, afin de voir si cette expression est modulée selon les conditions de culture et l'environnement de ces cellules.

6 Remerciements

Premièrement, j'aimerais remercier principalement le Dr Sophie Roux pour avoir cru en moi pour la réalisation de ces travaux. De plus, j'aimerais lui dire merci pour tout son expertise et sa passion dans ce domaine.

J'aimerais aussi remercier Dr Estelle Chamoux pour tous ses conseils et son expertise, Martine Bisson pour son dévouement et son écoute attentive, Maxime Gallant et Carol Richard pour toutes les rencontres quotidiennes devant la petite boisson caféine et Julie Couture, Steeve McManus et David Fong pour leur participation à l'avancement du laboratoire.

Un merci spécial à mes parents, ma sœur et à ma cousine pour leur support tout au long de ces deux années.

Finalement, j'aimerais remercier Dr Claire Dubois et Dr Nathalie Fauchoux pour avoir accepté de réviser mon mémoire de maîtrise.

Nicolas Houde

7 Références

- Adams, J. M., and Cory, S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy (2007) *Oncogene* **26**, 1324-1337
- Adrain, C., and Martin, S. J. The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas (2001) *Trends Biochem Sci* **26**, 390-397
- Alliston, T., Choy, L., Ducey, P., Karsenty, G., and Derynck, R. TGF-beta-induced repression of CBFA1 by Smad3 decreases cbfa1 and osteocalcin expression and inhibits osteoblast differentiation (2001) *EMBO J* **20**, 2254-2272
- Asagiri, M., and Takayanagi, H. The molecular understanding of osteoclast differentiation (2007) *Bone* **40**, 251-264
- Belmokhtar, C. A., Hillion, J., and Segal-Bendirdjian, E. Staurosporine induces apoptosis through both caspase-dependent and caspase-independent mechanisms (2001) *Oncogene* **20**, 3354-3362
- Bialik, S., and Kimchi, A. The death-associated protein kinases: structure, function, and beyond (2006) *Annu Rev Biochem* **75**, 189-210
- Birkey Reffey, S., Wurthner, J. U., Parks, W. T., Roberts, A. B., and Duckett, C. S. X-linked inhibitor of apoptosis protein functions as a cofactor in transforming growth factor-beta signaling (2001) *J Biol Chem* **276**, 26542-26549
- Bouchier-Hayes, L., Lartigue, L., and Newmeyer, D. D. Mitochondria: pharmacological manipulation of cell death (2005) *J Clin Invest* **115**, 2640-2647
- Boyce, B. F., and Xing, L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin (2007) *Arthritis Res Ther* **9 Suppl 1**, S1
- Boyce, B. F., and Xing, L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling (2008) *Arch Biochem Biophys* **473**, 139-146
- Boyle, W. J., Simonet, W. S., and Lacey, D. L. Osteoclast differentiation and activation (2003) *Nature* **423**, 337-342

- Brunetti, G., Oranger, A., Mori, G., Tamma, R., Di Benedetto, A., Pignataro, P., Grassi, F. R., Zallone, A., Grano, M., and Colucci, S. TRAIL is involved in human osteoclast apoptosis (2007) *Ann N Y Acad Sci* **1116**, 316-322
- Bruzzaniti, A., and Baron, R. Molecular regulation of osteoclast activity (2006) *Rev Endocr Metab Disord* **7**, 123-139
- Chamoux, E., Houde, N., L'Eriger, K., and Roux, S. Osteoprotegerin decreases human osteoclast apoptosis by inhibiting the TRAIL pathway (2008) *J Cell Physiol* **216**, 536-542
- Chowdhury, I., Tharakan, B., and Bhat, G. K. Current concepts in apoptosis: the physiological suicide program revisited (2006) *Cell Mol Biol Lett* **11**, 506-525
- Clybourn, C., McHichi, B. E., Hadji, A., Portier, A., Auffredou, M. T., Arnoult, D., Leca, G., and Vazquez, A. TGFbeta-mediated apoptosis of Burkitt's lymphoma BL41 cells is associated with the relocation of mitochondrial BimEL (2008) *Oncogene* **27**, 3446-3456
- Colucci, S., Brunetti, G., Cantatore, F. P., Oranger, A., Mori, G., Pignataro, P., Tamma, R., Grassi, F. R., Zallone, A., and Grano, M. The death receptor DR5 is involved in TRAIL-mediated human osteoclast apoptosis (2007) *Apoptosis* **12**, 1623-1632
- Colucci, S., Brunetti, G., Rizzi, R., Zonno, A., Mori, G., Colaianni, G., Del Prete, D., Faccio, R., Liso, A., Capalbo, S., Liso, V., Zallone, A., and Grano, M. T cells support osteoclastogenesis in an in vitro model derived from human multiple myeloma bone disease: the role of the OPG/TRAIL interaction (2004) *Blood* **104**, 3722-3730
- Couture, J., Chamoux, E., Morissette, J., Brown, J., and Roux, S. Functional consequences of p62 mutations in PDB osteoclasts (2007) *J Bone Min Res* **22**, S220
- Dabovic, B., Levasseur, R., Zambuto, L., Chen, Y., Karsenty, G., and Rifkin, D. B. Osteopetrosis-like phenotype in latent TGF-beta binding protein 3 deficient mice (2005) *Bone* **37**, 25-31
- Dallas, S. L., Park-Snyder, S., Miyazono, K., Twardzik, D., Mundy, G. R., and Bonewald, L. F. Characterization and autoregulation of latent transforming growth factor beta (TGF beta) complexes in osteoblast-like cell lines. Production of a latent complex lacking the latent TGF beta-binding protein (1994) *J Biol Chem* **269**, 6815-6821

- Davis, R. J. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases (2000) *Cell* **103**, 239-252
- Del Fattore, A., Teti, A., and Rucci, N. Osteoclast receptors and signaling (2008) *Arch Biochem Biophys* **473**, 147-160
- Edlund, S., Bu, S., Schuster, N., Aspenstrom, P., Heuchel, R., Heldin, N. E., ten Dijke, P., Heldin, C. H., and Landstrom, M. Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta)-induced apoptosis of prostate cancer cells involves Smad7-dependent activation of p38 by TGF-beta-activated kinase 1 and mitogen-activated protein kinase kinase 3 (2003) *Mol Biol Cell* **14**, 529-544
- Emery, J. G., McDonnell, P., Burke, M. B., Deen, K. C., Lyn, S., Silverman, C., Dul, E., Appelbaum, E. R., Eichman, C., DiPrinzio, R., Dodds, R. A., James, I. E., Rosenberg, M., Lee, J. C., and Young, P. R. Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL (1998) *J Biol Chem* **273**, 14363-14367
- Erlebacher, A., and Derynck, R. Increased expression of TGF-beta 2 in osteoblasts results in an osteoporosis-like phenotype (1996) *J Cell Biol* **132**, 195-210
- Fox, S. W., Evans, K. E., and Lovibond, A. C. Transforming growth factor-beta enables NFATc1 expression during osteoclastogenesis (2008) *Biochem Biophys Res Commun* **366**, 123-128
- Fox, S. W., and Lovibond, A. C. Current insights into the role of transforming growth factor-beta in bone resorption (2005) *Mol Cell Endocrinol* **243**, 19-26
- Franchi, A., Benvenuti, S., Masi, L., Malentacchi, C., Arganini, L., Brandi, M. L., and Santucci, M. TGF-beta isoform and receptor expression in giant cell tumor and giant cell lesions of bone (2001) *Appl Immunohistochem Mol Morphol* **9**, 170-175
- Francis, J. M., Heyworth, C. M., Spooncer, E., Pierce, A., Dexter, T. M., and Whetton, A. D. Transforming growth factor-beta 1 induces apoptosis independently of p53 and selectively reduces expression of Bcl-2 in multipotent hematopoietic cells (2000) *J Biol Chem* **275**, 39137-39145
- Fukuda, A., Hikita, A., Wakeyama, H., Akiyama, T., Oda, H., Nakamura, K., and Tanaka, S. Regulation of osteoclast apoptosis and motility by small GTPase binding protein Rac1 (2005) *J Bone Miner Res* **20**, 2245-2253

- Fuller, K., Lean, J. M., Bayley, K. E., Wani, M. R., and Chambers, T. J. A role for TGFbeta(1) in osteoclast differentiation and survival (2000) *J Cell Sci* **113** (Pt 13), 2445-2453
- Gentry, L. E., Lioubin, M. N., Purchio, A. F., and Marquardt, H. Molecular events in the processing of recombinant type 1 pre-pro-transforming growth factor beta to the mature polypeptide (1988) *Mol Cell Biol* **8**, 4162-4168
- Gingery, A., Bradley, E. W., Pederson, L., Ruan, M., Horwood, N. J., and Oursler, M. J. TGF-beta coordinately activates TAK1/MEK/AKT/NFkB and SMAD pathways to promote osteoclast survival (2008) *Exp Cell Res* **314**, 2725-2738
- Green, D. R., and Kroemer, G. Pharmacological manipulation of cell death: clinical applications in sight? (2005) *J Clin Invest* **115**, 2610-2617
- Griffith, T. S., Chin, W. A., Jackson, G. C., Lynch, D. H., and Kubin, M. Z. Intracellular regulation of TRAIL-induced apoptosis in human melanoma cells (1998) *J Immunol* **161**, 2833-2840
- Hadjidakis, D. J., and Androulakis, II. Bone remodeling (2006) *Ann N Y Acad Sci* **1092**, 385-396
- Halder, S. K., Beauchamp, R. D., and Datta, P. K. Smad7 induces tumorigenicity by blocking TGF-beta-induced growth inhibition and apoptosis (2005) *Exp Cell Res* **307**, 231-246
- Harper, N., Farrow, S. N., Kaptein, A., Cohen, G. M., and MacFarlane, M. Modulation of tumor necrosis factor apoptosis-inducing ligand- induced NF-kappa B activation by inhibition of apical caspases (2001) *J Biol Chem* **276**, 34743-34752
- Heeres, J. T., and Hergenrother, P. J. Poly(ADP-ribose) makes a date with death (2007) *Curr Opin Chem Biol* **11**, 644-653
- Hochberg, M. C. (2003), 3 rd ed.,
Hodge, J. M., Kirkland, M. A., Aitken, C. J., Waugh, C. M., Myers, D. E., Lopez, C. M., Adams, B. E., and Nicholson, G. C. Osteoclastic potential of human CFU-GM: biphasic effect of GM-CSF (2004) *J Bone Miner Res* **19**, 190-199
- Huang, H., Chang, E. J., Ryu, J., Lee, Z. H., Lee, Y., and Kim, H. H. Induction of c-Fos and NFATc1 during RANKL-stimulated osteoclast differentiation is mediated by the p38 signaling pathway (2006) *Biochem Biophys Res Commun* **351**, 99-105

- Huang, W., Yang, S., Shao, J., and Li, Y. P. Signaling and transcriptional regulation in osteoblast commitment and differentiation (2007) *Front Biosci* **12**, 3068-3092
- Hughes, D. E., and Boyce, B. F. Apoptosis in bone physiology and disease (1997) *Mol Pathol* **50**, 132-137
- Hughes, D. E., Dai, A., Tiffée, J. C., Li, H. H., Mundy, G. R., and Boyce, B. F. Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF-beta (1996) *Nat Med* **2**, 1132-1136
- Hunter, A. M., LaCasse, E. C., and Korneluk, R. G. The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets (2007) *Apoptosis* **12**, 1543-1568
- Janssens, K., ten Dijke, P., Janssens, S., and Van Hul, W. Transforming growth factor-beta1 to the bone (2005) *Endocr Rev* **26**, 743-774
- Javelaud, D., and Mauviel, A. Crosstalk mechanisms between the mitogen-activated protein kinase pathways and Smad signaling downstream of TGF-beta: implications for carcinogenesis (2005) *Oncogene* **24**, 5742-5750
- Jimi, E., Shuto, T., and Koga, T. Macrophage colony-stimulating factor and interleukin-1 alpha maintain the survival of osteoclast-like cells (1995) *Endocrinology* **136**, 808-811
- Junttila, M. R., Li, S. P., and Westermarck, J. Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival (2008) *FASEB J* **22**, 954-965
- Kale, V. P. Differential activation of MAPK signaling pathways by TGF-beta1 forms the molecular mechanism behind its dose-dependent bidirectional effects on hematopoiesis (2004) *Stem Cells Dev* **13**, 27-38
- Kale, V. P., and Vaidya, A. A. Molecular mechanisms behind the dose-dependent differential activation of MAPK pathways induced by transforming growth factor-beta1 in hematopoietic cells (2004) *Stem Cells Dev* **13**, 536-547
- Kaneda, T., Nojima, T., Nakagawa, M., Ogasawara, A., Kaneko, H., Sato, T., Mano, H., Kumegawa, M., and Hakeda, Y. Endogenous production of TGF-beta is essential for osteoclastogenesis induced by a combination of receptor activator of NF-kappa B ligand and macrophage-colony-stimulating factor (2000) *J Immunol* **165**, 4254-4263

- Karsdal, M. A., Fjording, M. S., Foged, N. T., Delaisse, J. M., and Lochter, A. Transforming growth factor-beta-induced osteoblast elongation regulates osteoclastic bone resorption through a p38 mitogen-activated protein kinase- and matrix metalloproteinase-dependent pathway (2001) *J Biol Chem* **276**, 39350-39358
- Karsdal, M. A., Hjorth, P., Henriksen, K., Kirkegaard, T., Nielsen, K. L., Lou, H., Delaisse, J. M., and Foged, N. T. Transforming growth factor-beta controls human osteoclastogenesis through the p38 MAPK and regulation of RANK expression (2003) *J Biol Chem* **278**, 44975-44987
- Kim, B. C., Mamura, M., Choi, K. S., Calabretta, B., and Kim, S. J. Transforming growth factor beta 1 induces apoptosis through cleavage of BAD in a Smad3-dependent mechanism in FaO hepatoma cells (2002) *Mol Cell Biol* **22**, 1369-1378
- Kingsley, L. A., Chirgwin, J. M., and Guise, T. A. Breaking new ground to build bone (2007) *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 10753-10754
- Krum, S. A., Miranda-Carboni, G. A., Hauschka, P. V., Carroll, J. S., Lane, T. F., Freedman, L. P., and Brown, M. Estrogen protects bone by inducing Fas ligand in osteoblasts to regulate osteoclast survival (2008) *EMBO J* **27**, 535-545
- Kuwana, T., and Newmeyer, D. D. Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis (2003) *Curr Opin Cell Biol* **15**, 691-699
- Lacey, D. L., Tan, H. L., Lu, J., Kaufman, S., Van, G., Qiu, W., Rattan, A., Scully, S., Fletcher, F., Juan, T., Kelley, M., Burgess, T. L., Boyle, W. J., and Polverino, A. J. Osteoprotegerin ligand modulates murine osteoclast survival in vitro and in vivo (2000) *Am J Pathol* **157**, 435-448
- Lavrik, I. N., Golks, A., and Krammer, P. H. Caspases: pharmacological manipulation of cell death (2005) *J Clin Invest* **115**, 2665-2672
- Marie, P. J. Transcription factors controlling osteoblastogenesis (2008) *Arch Biochem Biophys* **473**, 98-105
- Marks, S. C., Odgren, P.R. (2003), 2nd Edition ed., Academic Press
- Martin, S. S., and Vuori, K. Regulation of Bcl-2 proteins during anoikis and amorphosis (2004) *Biochim Biophys Acta* **1692**, 145-157
- Massague, J., Seoane, J., and Wotton, D. Smad transcription factors (2005) *Genes Dev* **19**, 2783-2810

Mazars, A., Lallemand, F., Prunier, C., Marais, J., Ferrand, N., Pessah, M., Cherqui, G., and Atfi, A. Evidence for a role of the JNK cascade in Smad7-mediated apoptosis (2001) *J Biol Chem* **276**, 36797-36803

Représentation du remodelage osseux. (2005).

Mohammad, K. S. (2008) Transforming Growth Factor-beta receptor I kinase inhibitor increases bone mass in Normal Mice. ASBMR
Montréal

Motyl, T., Gajkowska, B., Ploszaj, T., Wareski, P., Skierski, J., and Zimowska, W. Expression and subcellular redistribution of Bax during TGF-beta1-induced programmed cell death of HC11 mouse mammary epithelial cells (2000) *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **46**, 175-185

Mulari, M. T., Zhao, H., Lakkakorpi, P. T., and Vaananen, H. K. Osteoclast ruffled border has distinct subdomains for secretion and degraded matrix uptake (2003) *Traffic* **4**, 113-125

Nachmias, B., Ashhab, Y., and Ben-Yehuda, D. The inhibitor of apoptosis protein family (IAPs): an emerging therapeutic target in cancer (2004) *Semin Cancer Biol* **14**, 231-243

Nadiri, A., Wolinski, M. K., and Saleh, M. The inflammatory caspases: key players in the host response to pathogenic invasion and sepsis (2006) *J Immunol* **177**, 4239-4245

Nagata, S. Apoptotic DNA fragmentation (2000) *Exp Cell Res* **256**, 12-18

Noble, B. S. The osteocyte lineage (2008) *Arch Biochem Biophys* **473**, 106-111

Ohgushi, M., Kuroki, S., Fukamachi, H., O'Reilly, L. A., Kuida, K., Strasser, A., and Yonehara, S. Transforming growth factor beta-dependent sequential activation of Smad, Bim, and caspase-9 mediates physiological apoptosis in gastric epithelial cells (2005) *Mol Cell Biol* **25**, 10017-10028

Okahashi, N., Koide, M., Jimi, E., Suda, T., and Nishihara, T. Caspases (interleukin-1beta-converting enzyme family proteases) are involved in the regulation of the survival of osteoclasts (1998) *Bone* **23**, 33-41

Olson, J. M., and Hallahan, A. R. p38 MAP kinase: a convergence point in cancer therapy (2004) *Trends Mol Med* **10**, 125-129

Orcel, P., Bielakoff, J., and De Vernejoul, M. C. Effects of transforming growth factor-beta on long-term human cord blood monocyte cultures (1990) *J Cell Physiol* **142**, 293-298

- Polsky, D., and Cordon-Cardo, C. Oncogenes in melanoma (2003) *Oncogene* **22**, 3087-3091
- Rahimi, R. A., and Leof, E. B. TGF-beta signaling: a tale of two responses (2007) *J Cell Biochem* **102**, 593-608
- Ramesh, S., Qi, X. J., Wildey, G. M., Robinson, J., Molkentin, J., Letterio, J., and Howe, P. H. TGFbeta-mediated BIM expression and apoptosis are regulated through SMAD3-dependent expression of the MAPK phosphatase MKP2 (2008) *EMBO Rep*
- Ramjaun, A. R., Tomlinson, S., Eddaoudi, A., and Downward, J. Upregulation of two BH3-only proteins, Bmf and Bim, during TGF beta-induced apoptosis (2007) *Oncogene* **26**, 970-981
- Ren, W., Wu, B., Peng, X., Hua, J., Hao, H. N., and Wooley, P. H. Implant wear induces inflammation, but not osteoclastic bone resorption, in RANK(-/-) mice (2006) *J Orthop Res* **24**, 1575-1586
- Riggs, B. L., and Parfitt, A. M. Drugs used to treat osteoporosis: the critical need for a uniform nomenclature based on their action on bone remodeling (2005) *J Bone Miner Res* **20**, 177-184
- Rivera-Walsh, I., Cvijic, M. E., Xiao, G., and Sun, S. C. The NF-kappa B signaling pathway is not required for Fas ligand gene induction but mediates protection from activation-induced cell death (2000) *J Biol Chem* **275**, 25222-25230
- Roodman, G. D. Regulation of osteoclast differentiation (2006) *Ann N Y Acad Sci* **1068**, 100-109
- Roux, S., Lambert-Comeau, P., Saint-Pierre, C., Lepine, M., Sawan, B., and Parent, J. L. Death receptors, Fas and TRAIL receptors, are involved in human osteoclast apoptosis (2005) *Biochem Biophys Res Commun* **333**, 42-50
- Roux, S., and Orcel, P. Bone loss. Factors that regulate osteoclast differentiation: an update (2000) *Arthritis Res* **2**, 451-456
- Roux, S., Quinn, J., Pichaud, F., Orcel, P., Chastre, E., Jullienne, A., and De Vernejoul, M. C. Human cord blood monocytes undergo terminal osteoclast differentiation in vitro in the presence of culture medium conditioned by giant cell tumor of bone (1996) *J Cell Physiol* **168**, 489-498
- Roux, S. C. E. (2007) Osteoclast apoptosis. in *Cell apoptotic signaling pathways* (Pickens, C. O. ed.), Nova Science Publishers, Hauppauge, NY. pp 163-184

- Saintier, D., Khanine, V., Uzan, B., Ea, H. K., de Vernejoul, M. C., and Cohen-Solal, M. E. Estradiol inhibits adhesion and promotes apoptosis in murine osteoclasts in vitro (2006) *J Steroid Biochem Mol Biol* **99**, 165-173
- Saltel, F., Chabadel, A., Bonnelye, E., and Jurdic, P. Actin cytoskeletal organisation in osteoclasts: A model to decipher transmigration and matrix degradation (2008) *Eur J Cell Biol*
- Sanchez-Capelo, A. Dual role for TGF-beta1 in apoptosis (2005) *Cytokine Growth Factor Rev* **16**, 15-34
- Scatizzi, J. C., Bickel, E., Hutcheson, J., Haines, G. K., 3rd, and Perlman, H. Bim deficiency leads to exacerbation and prolongation of joint inflammation in experimental arthritis (2006) *Arthritis Rheum* **54**, 3182-3193
- Schulze-Osthoff, K., Ferrari, D., Los, M., Wesselborg, S., and Peter, M. E. Apoptosis signaling by death receptors (1998) *Eur J Biochem* **254**, 439-459
- Schwarz, E. M., and Ritchlin, C. T. Clinical development of anti-RANKL therapy (2007) *Arthritis Res Ther* **9 Suppl 1**, S7
- Sheikh, M. S., Hollander, M. C., and Fornace, A. J., Jr. Role of Gadd45 in apoptosis (2000) *Biochem Pharmacol* **59**, 43-45
- Shiotani, A., Takami, M., Itoh, K., Shibasaki, Y., and Sasaki, T. Regulation of osteoclast differentiation and function by receptor activator of NFkB ligand and osteoprotegerin (2002) *Anat Rec* **268**, 137-146
- Silacci, P., Mazzolai, L., Gauci, C., Stergiopulos, N., Yin, H. L., and Hayoz, D. Gelsolin superfamily proteins: key regulators of cellular functions (2004) *Cell Mol Life Sci* **61**, 2614-2623
- Sumbayev, V. V., and Yasinska, I. M. Regulation of MAP kinase-dependent apoptotic pathway: implication of reactive oxygen and nitrogen species (2005) *Arch Biochem Biophys* **436**, 406-412
- Takai, H., Kanematsu, M., Yano, K., Tsuda, E., Higashio, K., Ikeda, K., Watanabe, K., and Yamada, Y. Transforming growth factor-beta stimulates the production of osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor by bone marrow stromal cells (1998) *J Biol Chem* **273**, 27091-27096
- Tanaka, S., Miyazaki, T., Fukuda, A., Akiyama, T., Kadono, Y., Wakeyama, H., Kono, S., Hoshikawa, S., Nakamura, M., Ohshima, Y., Hikita, A., Nakamura, I., and Nakamura, K. Molecular mechanism of the life and death of the osteoclast (2006) *Ann N Y Acad Sci* **1068**, 180-186

- Teitelbaum, S. L., and Ross, F. P. Genetic regulation of osteoclast development and function (2003) *Nat Rev Genet* **4**, 638-649
- Teramoto, T., Kiss, A., and Thorgeirsson, S. S. Induction of p53 and Bax during TGF-beta 1 initiated apoptosis in rat liver epithelial cells (1998) *Biochem Biophys Res Commun* **251**, 56-60
- Truneh, A., Sharma, S., Silverman, C., Khandekar, S., Reddy, M. P., Deen, K. C., McLaughlin, M. M., Srinivasula, S. M., Livi, G. P., Marshall, L. A., Alnemri, E. S., Williams, W. V., and Doyle, M. L. Temperature-sensitive differential affinity of TRAIL for its receptors. DR5 is the highest affinity receptor (2000) *J Biol Chem* **275**, 23319-23325
- Vitovski, S., Phillips, J. S., Sayers, J., and Croucher, P. I. Investigating the interaction between osteoprotegerin and receptor activator of NF-kappaB or tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand: evidence for a pivotal role for osteoprotegerin in regulating two distinct pathways (2007) *J Biol Chem* **282**, 31601-31609
- Wang, Z. B., Liu, Y. Q., and Cui, Y. F. Pathways to caspase activation (2005) *Cell Biol Int* **29**, 489-496
- Wildev, G. M., Patil, S., and Howe, P. H. Smad3 potentiates transforming growth factor beta (TGFbeta)-induced apoptosis and expression of the BH3-only protein Bim in WEHI 231 B lymphocytes (2003) *J Biol Chem* **278**, 18069-18077
- Wittrant, Y., Couillaud, S., Theoleyre, S., Dunstan, C., Heymann, D., and Redini, F. Osteoprotegerin differentially regulates protease expression in osteoclast cultures (2002) *Biochem Biophys Res Commun* **293**, 38-44
- Wrana, J. L., Attisano, L., Wieser, R., Ventura, F., and Massague, J. Mechanism of activation of the TGF-beta receptor (1994) *Nature* **370**, 341-347
- Xing, L., and Boyce, B. F. Regulation of apoptosis in osteoclasts and osteoblastic cells (2005) *Biochem Biophys Res Commun* **328**, 709-720
- Yamashita, T., Kobayashi, Y., Mizoguchi, T., Yamaki, M., Miura, T., Tanaka, S., Udagawa, N., and Takahashi, N. MKK6-p38 MAPK signaling pathway enhances survival but not bone-resorbing activity of osteoclasts (2008) *Biochem Biophys Res Commun* **365**, 252-257
- Yoo, J., Ghiassi, M., Jirmanova, L., Balliet, A. G., Hoffman, B., Fornace, A. J., Jr., Liebermann, D. A., Bottinger, E. P., and Roberts, A. B. Transforming growth factor-beta-induced apoptosis is mediated by Smad-dependent

- expression of GADD45b through p38 activation (2003) *J Biol Chem* **278**, 43001-43007
- Yu, J., Zhang, L., Chen, A., Xiang, G., Wang, Y., Wu, J., Mitchelson, K., Cheng, J., and Zhou, Y. Identification of the gene transcription and apoptosis mediated by TGF-beta-Smad2/3-Smad4 signaling (2008) *J Cell Physiol* **215**, 422-433
- Yu, L., Hebert, M. C., and Zhang, Y. E. TGF-beta receptor-activated p38 MAP kinase mediates Smad-independent TGF-beta responses (2002) *EMBO J* **21**, 3749-3759
- Zhao, H., Oka, K., Bringas, P., Kaartinen, V., and Chai, Y. TGF-beta type I receptor Alk5 regulates tooth initiation and mandible patterning in a type II receptor-independent manner (2008) *Dev Biol* **320**, 19-29
- Zheng, M. H., Fan, Y., Wysocki, S. J., Lau, A. T., Robertson, T., Beilharz, M., Wood, D. J., and Papadimitriou, J. M. Gene expression of transforming growth factor-beta 1 and its type II receptor in giant cell tumors of bone. Possible involvement in osteoclast-like cell migration (1994) *Am J Pathol* **145**, 1095-1104

8 Annexe